

**WO2004006662**

Publication Title:

DISEASE MODEL ANIMAL CARRYING FOREIGN PPARalpha GENE  
TRANSFERRED THEREINTO AND USE THEREOF

Abstract:

Abstract of WO2004006662

It is intended to provide a nonhuman mammal or a part of its body in which a foreign PPARalpha-encoding DNA is stably carried in an expressible state and which has one or more other gene modifications causing a pathology identical or similar to a diseases in which PPARalpha activity regulation participates or carries a foreign DNA under the regulation by a promoter having PPRE; and a method of screening a foreign PPARalpha agonist/antagonist with the use of the above animal. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 1 月 22 日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/006662 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A01K 67/027, C12N 15/09,  
5/10, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/50, A61K 45/00,  
A61P 1/16, 3/04, 3/06, 3/10, 7/02, 7/06, 9/10, 9/12, 13/12,  
15/00, 17/02, 25/28, 27/02, 35/00, 37/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008921

(22) 国際出願日: 2003 年 7 月 14 日 (14.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-206162 2002 年 7 月 15 日 (15.07.2002) JP

大阪市 四条町 3-2 2 Osaka (JP). 武富 滋久 (TAKE-  
TOMI, Shigehisa) [JP/JP]; 〒662-0095 兵庫県 西宮市 美  
作町 6-3 6 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.);  
〒532-0024 大阪府 大阪市 淀川区 十三本町 2 丁目  
1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-  
aka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修  
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 天野 雄一郎  
(AMANO, Yuichiro) [JP/JP]; 〒533-0022 大阪府 大阪市  
東淀川区菅原 7 丁目 1-1 9-8 0 2 Osaka (JP). 杉  
山 泰雄 (SUGIYAMA, Yasuo) [JP/JP]; 〒666-0111 兵庫  
県 川西市 大和東 5 丁目 7-2 Hyogo (JP). 西田 真由  
美 (NISHIDA, Mayumi) [JP/JP]; 〒579-8053 大阪府 東

WO 2004/006662 A1

(54) Title: DISEASE MODEL ANIMAL CARRYING FOREIGN PPAR $\alpha$  GENE TRANSFERRED THEREINTO AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 異種 PPAR $\alpha$  遺伝子導入疾患モデル動物およびその用途

(57) Abstract: It is intended to provide a nonhuman mammal or a part of its body in which a foreign PPAR $\alpha$ -encoding DNA is stably carried in an expressible state and which has one or more other gene modifications causing a pathology identical or similar to a diseases in which PPAR $\alpha$  activity regulation participates or carries a foreign DNA under the regulation by a promoter having PPRE; and a method of screening a foreign PPAR $\alpha$  agonist/antagonist with the use of the above animal.

(57) 要約: 本発明は、異種 PPAR $\alpha$  をコードする DNA を発現可能な状態で安定に保持し、且つ PPAR $\alpha$  の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる 1 以上の他の遺伝子改変、あるいは PPRE を有するプロモーターの制御下にある外来 DNA を有する非ヒト哺乳動物またはその生体の一部、並びに該動物を用いた異種 PPAR $\alpha$  作動薬/拮抗薬のスクリーニング方法を提供する。

## 明 細 書

異種PPAR $\alpha$ 遺伝子導入疾患モデル動物およびその用途

## 5 技術分野

本発明は異種PPAR $\alpha$ 遺伝子導入非ヒト哺乳動物に関する。より詳細には、本発明は、異種PPAR $\alpha$ 遺伝子が導入され、且つPPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患の実験的動物モデルとして使用し得る表現型を示す遺伝子  
10 変異を有する非ヒト哺乳動物、およびそれを用いた異種PPAR $\alpha$ の由来する動物におけるPPAR $\alpha$ の活性調節が関与する各種疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法、該方法により得られうる該疾患の予防・治療薬に関する。

## 背景技術

15 ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; 以下、PPARと略記する)  $\alpha$ は肝臓、心臓、腎臓等で高発現する核内レセプター型転写因子であり、脂肪酸 $\beta$ 酸化系酵素群やアポリポ蛋白などの種々の脂質代謝関連蛋白質をコードする遺伝子の発現を調節することにより、脂質のホメオスタシスにおいて中心的な役割を担っている。  
20 PPAR $\alpha$ はレチノイドXレセプター (RXR) とヘテロダイマーを形成し、リガンド存在下に標的遺伝子の5' 上流に存在するペルオキシソーム増殖剤応答エレメント (PPRE) 配列に結合して遺伝子の転写を促進する。一方で、PPAR $\alpha$ によってリガンド存在下に発現が抑制される遺伝子も知られているが、これは他の転写因子との標的DNA配列への結合やコアクチ  
25 ベーターをめぐる競合によるものと考えられている。

PPAR $\alpha$ は長鎖不飽和脂肪酸やフィブレート系薬剤などの脂溶性分子によって活性化される。PPAR $\alpha$ 作動薬は肝臓において脂肪酸酸化活性を高める一方で、アポリポ蛋白 C-III (apoC-III ; 中性脂肪 (TG) との主要な血漿リポ蛋白構成成分) の発現を抑制するため、血中TG濃度を低下させる

効果がある。また、高比重リポ蛋白-コレステロール (HDL-C) の主要構成成分であるアポリポ蛋白 A-I (apoA-I) およびアポリポ蛋白 A-II (apoA-II) の発現を促進するため、血中HDL-C濃度を増加させる効果がある。したがって、PPAR $\alpha$ 作動薬は高TG血症や低HDL-C血症を含む高脂血症、および動脈硬化の予防・治療薬として実際に用いられている (例えば、ジャン-シャルル・フルシャル (Jean-Charles Fruchart) ら, カレント・アテロスクレローシス・リポート (Current Atherosclerosis Reports), (米国), 2001年, 第3巻 (第1号), p. 83-92を参照)。PPAR $\alpha$ 作動薬はまた、虚血に対して心臓保護効果を示すことも知られている (例えば、アントニア・タベルネロ (Antonia Tabernero) ら, ビーエムシー・ファーマコロジー (BMC Pharmacology), (英国), 2002年4月9日 (オンライン公開), バイオメッド・セントラル (BioMed Central), インターネット<<http://www.biomedcentral.com/1471-2210/2/10>>を参照)。

新規PPAR $\alpha$ 作動薬の開発は、通常、例えばヒトPPAR $\alpha$ を用いた結合アッセイやヒト細胞株におけるPPRE制御下にある遺伝子 (例: apoA-I, PPRE-レポーターキメラ遺伝子等) の発現アッセイなどのインビトロでのスクリーニングを行ない、高活性が得られた化合物についてマウスやラットなどの実験動物に投与してインビボでの効果を評価するといった順序で進められる。しかしながら、ヒトと他の哺乳動物との間にはPPAR $\alpha$ の構造に差異があるため (例えば、ヒトとマウスの間のアミノ酸同一性は92%)、薬物によってはヒトPPAR $\alpha$ に対してしかアゴニスト活性を示さない場合もあり得る。そのような薬物は実験動物の内因性PPAR $\alpha$ に対しては活性がないので、現存の動物モデルでは評価することが不可能であった。

したがって、本発明の目的は、ヒトPPAR $\alpha$ に対してのみアゴニスト活性を示すPPAR $\alpha$ 作動薬のインビボでの効果を有効に評価することができる新規動物モデルを提供することであり、当該動物モデルを用いた、高脂血症、混合型脂質異常症、動脈硬化、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、虚血性脳疾患などの各種疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法を提供することである。

## 発明の開示

本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒトPPAR $\alpha$ をコードするDNAを発現可能な状態で安定に保持するトランスジェニックマウスを作製し、これにヒトPPAR $\alpha$ に対して活性を有するが、マウスPPAR $\alpha$ に対しては活性を有しない化合物を投与したところ、当該マウスはペルオキシソーム増殖や脂質代謝関連遺伝子の発現増強を含む、ペルオキシソーム増殖剤により誘導される種々の特徴的応答を示すことを見出した。さらに、得られたヒトPPAR $\alpha$ 発現トランスジェニックマウスと、高脂血症や動脈硬化をはじめとするPPAR $\alpha$ の活性調節が関与し得る各種疾患の実験的動物モデルとを交配することにより、ヒトPPAR $\alpha$ を発現する当該疾患モデル動物を作製することに成功した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

[1] 異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを発現可能な状態で安定に保持し、且つ1以上の他の遺伝子改変を有する非ヒト哺乳動物またはその生体の一部、

[2] 他の遺伝子改変の少なくとも1つが、PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせるものである、上記[1]記載の動物またはその生体の一部、

[3] 他の遺伝子改変の少なくとも1つが、PPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAの導入である、上記[1]記載の動物またはその生体の一部、

[4] 異種PPAR $\alpha$ がヒト由来PPAR $\alpha$ である上記[1]記載の動物またはその生体の一部、

[5] 異種PPAR $\alpha$ が配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する上記[1]記載の動物またはその生体の一部、

[6] 非ヒト哺乳動物が、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、

マウスまたはラットである上記〔1〕記載の動物またはその生体の一部、

〔7〕非ヒト哺乳動物がマウスである上記〔1〕記載の動物またはその生体の一部、

〔8〕内因性PPAR $\alpha$ を欠損するかわりに異種PPAR $\alpha$ を発現させた動物である上記〔1〕記載の動物またはその生体の一部、

〔9〕内因性PPAR $\alpha$ を欠損する動物と、異種PPAR $\alpha$ を発現する、該動物と同種の動物とを交配することにより得られうる、上記〔8〕記載の動物またはその生体の一部、

〔10〕内因性PPAR $\alpha$ がマウス由来PPAR $\alpha$ であり、異種PPAR $\alpha$ がヒト由来PPAR $\alpha$ である上記〔8〕記載の動物またはその生体の一部、

〔11〕PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患が、高脂血症、高トリグリセリド血症、混合型脂質異常症、低HDL血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、壊疽、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血性心不全、不安定狭心症、PTCA後の再狭窄、ステント留置後の再狭窄、高フィブリノーゲン血症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、アルツハイマー病、貧血性低酸素症、性腺障害、肝臓癌、乳癌および子宮内膜炎からなる群より選択される1もしくは2以上の疾患である上記〔2〕記載の動物またはその生体の一部、

〔12〕異種PPAR $\alpha$ が、肝臓、心臓、腎臓、副腎、血管、消化管および脳からなる群より選択される1もしくは2以上の部位で特異的に発現することを特徴とする上記〔1〕記載の動物またはその生体の一部、

〔13〕異種PPAR $\alpha$ が、肝臓で特異的に発現することを特徴とする上記〔1〕記載の動物またはその生体の一部、

〔14〕上記〔1〕記載の動物またはその生体の一部に被験物質を適用し、該物質の異種PPAR $\alpha$ に対するアゴニストまたはアンタゴニスト活性を検定することを特徴とする異種PPAR $\alpha$ 作動薬または拮抗薬のスクリーニング方法、

[15] 上記[3]記載の動物またはその生体の一部に被験物質を適用し、  
該物質の異種PPAR $\alpha$ に対するアゴニストまたはアンタゴニスト活性を、  
PPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAの発現を指標にし  
て検定することを特徴とする、異種PPAR $\alpha$ 作動薬または拮抗薬のスクリ  
5 ーニング方法、および

[16] 上記[2]記載の動物に被験物質を投与し、該動物におけるPPA  
R $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態に及ぼす該物質の  
効果を検定することを特徴とする、異種PPAR $\alpha$ の由来する動物における  
該PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患に対して予防・治療活性を有する物  
10 質のスクリーニング方法を提供する。

さらに、本発明は、

[17] 上記[14]または[15]記載の方法により得られうる異種PP  
AR $\alpha$ 作動薬、

[18] 上記[17]記載の作動薬を含有してなる、異種PPAR $\alpha$ の由来  
15 する動物における高脂血症、高トリグリセリド血症、混合型脂質異常症、低  
HDL血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、壊疽、高血圧症、  
血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血性心不全、不安定狭心  
症、PTCA後の再狭窄、ステント留置後の再狭窄、高フィブリノーゲン血  
症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、  
20 糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、  
脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、アルツハイマ  
ー病、貧血性低酸素症および性腺障害からなる群より選択される1もしくは  
2以上の疾患の予防・治療薬、

[19] 異種PPAR $\alpha$ の由来する動物がヒトである上記[18]記載の予  
25 防・治療薬、

[20] 上記[17]記載の作動薬の有効量を異種PPAR $\alpha$ の由来する動  
物に投与することを含む、該動物における高脂血症、高トリグリセリド血症、  
混合型脂質異常症、低HDL血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、間欠性跛  
行、壊疽、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血

性心不全、不安定狭心症、P T C A後の再狭窄、ステント留置後の再狭窄、高フィブリノーゲン血症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、アルツハイマー病、貧血性低酸素症および性腺障害からなる群より選択される1もしくは2以上の疾患の予防・治療方法、

5 [21] 異種P P A R  $\alpha$ の由来する動物における高脂血症、高トリグリセリド血症、混合型脂質異常症、低H D L血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、壊疽、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血性心不全、不安定狭心症、P T C A後の再狭窄、ステント留置後の再狭窄、高フィブリノーゲン血症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、アルツハイマー病、貧血性低酸素症および性腺障害からなる群より選択される1もしくは2以上の疾患の予防・治療薬の製造のための、上記[17]記載の作動薬の使用、

10 [22] 上記[14]または[15]記載の方法により得られうる異種P P A R  $\alpha$ 拮抗薬、

[23] 上記[22]記載の拮抗薬を含有してなる、異種P P A R  $\alpha$ の由来する動物における肝臓癌、乳癌および子宮内膜炎からなる群より選択される1もしくは2以上の疾患の予防・治療薬、

15 [24] 異種P P A R  $\alpha$ の由来する動物がヒトである上記[23]記載の予防・治療薬、

[25] 上記[22]記載の拮抗薬の有効量を異種P P A R  $\alpha$ の由来する動物に投与することを含む、該動物における肝臓癌、乳癌および子宮内膜炎からなる群より選択される1もしくは2以上の疾患の予防・治療方法、

20 [26] 異種P P A R  $\alpha$ の由来する動物における肝臓癌、乳癌および子宮内膜炎からなる群より選択される1もしくは2以上の疾患の予防・治療薬を製造するための、上記[22]記載の拮抗薬の使用、



〔27〕上記〔16〕記載の方法により得られうる、異種PPAR $\alpha$ の由来する動物における該PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患に対して予防・治療活性を有する物質、

5      〔28〕上記〔27〕記載の物質を含有してなる、異種PPAR $\alpha$ の由来する動物における該PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患の予防・治療薬、

10      〔29〕異種PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患が、高脂血症、高トリグリセリド血症、混合型脂質異常症、低HDL血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、壊疽、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血性心不全、不安定狭心症、PTCA後の再狭窄、ステント留置後の再狭窄、高フィブリノーゲン血症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、  
15      脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、アルツハイマー病、貧血性低酸素症および性腺障害からなる群より選択される1もしくは2以上の疾患である上記〔28〕記載の  
15      予防・治療薬、

〔30〕上記〔27〕記載の物質の有効量を異種PPAR $\alpha$ の由来する動物に投与することを含む、該動物におけるPPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患の予防・治療方法、および

20      〔31〕異種PPAR $\alpha$ の由来する動物における該PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患の予防・治療薬の製造のための、上記〔27〕記載の物質の使用  
などを提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

25      図1は、ヒトPPAR $\alpha$ 発現ベクターpKS-SEPP2の制限酵素地図を示す図である。図中の矢印は転写方向を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の異種PPAR $\alpha$ 遺伝子導入非ヒト哺乳動物は、該異種PPAR $\alpha$

に対しては作用するが、該非ヒト哺乳動物の内因性PPAR $\alpha$ に対しては作用しないPPAR $\alpha$ 作動薬もしくは拮抗薬の薬効をインビボで評価し得る動物モデルである。

異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを発現可能な状態で安定に保持する非  
5 ヒト哺乳動物（以下、「本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物」または単に「本  
発明の遺伝子導入動物」という場合もある）は、異種PPAR $\alpha$ をコードす  
るDNAを発現可能な状態で「安定に保持」する。「安定に保持」とは、該  
動物の細胞内に異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAが発現可能な状態で永続  
的に存在することを意味し、該DNAが宿主染色体上に組み込まれていても、  
10 あるいは染色体外DNAとして安定に存在していてもよいが、好ましくは、  
該DNAは宿主染色体上に組み込まれた状態で保持される。

本発明の遺伝子導入動物は、非ヒト哺乳動物の受精卵や、未受精卵、精子  
およびその前駆細胞（始原生殖細胞、卵原細胞、卵母細胞、卵細胞、精原細  
胞、精母細胞、精細胞等）などに、好ましくは受精卵の胚発生の初期段階  
15 （さらに好ましくは8細胞期以前）において、リン酸カルシウム共沈殿法、  
電気穿孔（エレクトロポレーション）法、リポフェクション法、凝集法、顕  
微注入（マイクロインジェクション）法、遺伝子銃（パーティクルガン）法、  
DEAE-デキストラン法などの遺伝子導入法によって、目的とする異種P  
PAR $\alpha$ をコードするDNAを導入することにより作製される。また、該遺  
20 伝子導入法により、非ヒト哺乳動物の体細胞、組織、臓器などに目的とする  
DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、  
この細胞を上述の胚（もしくは生殖）細胞と公知の細胞融合法を用いて融合  
させることにより遺伝子導入動物を作製することもできる。あるいは、ノッ  
クアウト動物を作製する場合と同様に、非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞（ES  
25 細胞）に上記の遺伝子導入法を用いて目的とするDNAを導入し、予め該D  
NAが安定に組み込まれたクローンを選択した後に、該ES細胞を胚盤胞に  
注入するかあるいはES細胞塊と8細胞期胚とを凝集させてキメラマウスを  
作製し、生殖系列に導入DNAが伝達されたものを選択することによっても  
遺伝子導入動物を得ることが可能である。

また、このようにして作製された遺伝子導入動物の生体の一部（例えば、  
①異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを安定に保持する細胞、組織、臓器な  
ど、②これらに由来する細胞または組織を培養し、必要に応じて継代したも  
のなど）も、本発明の「異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを発現可能な状  
態で安定に保持する非ヒト哺乳動物の生体の一部」として、本発明の「異種  
5 PPAR $\alpha$ をコードするDNAを発現可能な状態で安定に保持する非ヒト哺  
乳動物」と同様な目的に用いることができる。

本発明の遺伝子導入動物の生体の一部としては、肝臓、心臓、腎臓、副腎、  
血管、消化管、脳などの臓器や、当該臓器由来の組織片および細胞などが好  
10 ましく例示される。

本発明で対象とし得る「非ヒト哺乳動物」は、トランスジェニック系が確  
立されたヒト以外の哺乳動物であれば特に制限はなく、例えば、ウシ、サル、  
ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラッ  
ト、マウスなどが挙げられる。好ましくは、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモッ  
15 ト、ハムスター、マウス、ラット等であり、なかでも疾患モデル動物作製の  
面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、繁殖が容易な齧歯動物が  
より好ましく、とりわけマウス（例えば、純系としてC57BL/6系統、  
DBA2系統など、交雑系としてB6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D  
2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）およびラット（例えば、  
20 Wistar、SDなど）が好ましい。

また、哺乳動物以外にもニワトリなどの鳥類が本発明で対象とする「非ヒ  
ト哺乳動物」と同様の目的に用いることができる。

「異種PPAR $\alpha$ をコードするDNA」とは、遺伝子導入の対象となる非ヒ  
ト哺乳動物（例えば、マウス）にとって異種の哺乳動物（例えば、ヒト、ウ  
シ、サル、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムス  
25 ター、ラットなど）由来のPPAR $\alpha$ もしくはそれと実質的に同一のアミノ  
酸配列を有する蛋白質をコードするDNAを意味する。好ましくは、本発明  
の異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAは、ヒトPPAR $\alpha$ もしくはそれと実  
質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAである。ヒト

- PPAR $\alpha$ をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列をコードするDNA、好ましくは配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNAが挙げられる。「実質的に同一のアミノ酸配列」としては、例えばヒトPPAR $\alpha$ の場合、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは約98%以上の同一性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。アミノ酸配列の同一性は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; マトリクス=BLOSUM62; フィルタリング=OFF) にて計算することができる。
- 「実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質」としては、例えばヒトPPAR $\alpha$ の場合、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質が好ましい。「実質的に同質の活性」としては、例えば、リガンド (アゴニスト、アンタゴニストを含む) 結合活性、脂質代謝関連遺伝子の発現調節作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性や脂質代謝関連遺伝子の発現調節作用などの活性が同等 (例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍) であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。リガンド結合活性や脂質代謝関連遺伝子の発現調節作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。
- 異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAは、例えば配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNAのように、イントロンを含まない形態 (即ち、相補DNA) であることが好ましいが、イントロンの5' および3' 末端配列はほとんどの真核生物遺伝子で共通であるので、別の実施態様においてはイントロンを含む形態 (即ち、ゲノムDNA) もまた好ましく用いられ得る。

異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAは、ヒトや各種非ヒト哺乳動物（ウシ、サル、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）の肝臓、心臓、腎臓、副腎、血管、消化管などに由来するDNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーに由来するゲノムDNAの全てあるいは一部を原料として用い、あるいはヒトや各種非ヒト哺乳動物の肝臓、心臓、腎臓、副腎、血管、消化管などに由来するRNAから公知の方法により調製されたcDNAを原料として用い、公知のPPAR $\alpha$ 遺伝子配列をもとに作製したオリゴヌクレオチドをプローブもしくはプライマーとして、ハイブリダイゼーション法もしくはPCR法などにより単離することができる。

本発明の遺伝子導入動物は、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを「発現可能な状態で」保持している。したがって、当該DNAを対象動物に導入するにあたっては、当該DNAを対象動物の細胞内で機能し得るプロモーターの下流に連結した発現カセットを含む形態（例、発現ベクターなど）で用いるのが一般に有利である。

異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを担持するベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物もしくは昆虫ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられ、特に大腸菌由来のプラスミドが好ましい。

異種PPAR $\alpha$ の遺伝子発現調節を行うプロモーターとしては、例えばウイルス（サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルスなど）に由来する遺伝子のプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウシ、サル、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（ニワトリなど）に由来する遺伝子〔例えば、アルブミン、エンドセリン、オステオカルシン、筋クレアチンキナーゼ、I型およびII型コラーゲン、サイクリックAMP依存蛋白キナ

ーゼ $\beta$  I サブユニット、心房ナトリウム利尿性因子、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I および I I A、メタロプロティナーゼ 1 組織インヒビター、平滑筋 $\alpha$ アクチン、ポリペプチド鎖伸長因子 1  $\alpha$  (EF 1- $\alpha$ )、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 および 2、ミエリン塩基性蛋白、血清アミロイド P コンポーネント、レニンなど] のプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、目的とする疾患モデルに応じて、標的組織で異種 P P A R  $\alpha$  を特異的もしくは高発現させ得るプロモーター (例: 肝臓で高発現可能な血清アミロイド P コンポーネント (S A P)、アルブミン、トランスフェリン、フィブリノーゲン、アンチトロンビン III、 $\alpha$  1-アンチトリプシンなどの遺伝子プロモーター; 心臓で高発現可能な $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 および 2 などの遺伝子プロモーター; 腎臓で高発現可能な P T H / P T H r P 受容体などの遺伝子プロモーター; 副腎で高発現可能な A C T H 受容体などの遺伝子プロモーター; 消化管で高発現可能な脂肪酸結合蛋白質などの遺伝子プロモーター; 脳で高発現可能なミエリン塩基性蛋白、グリア線維性酸性蛋白などの遺伝子プロモーター等) を適宜選択することができる。例えば、本発明の遺伝子導入動物が高脂血症や動脈硬化症のモデルである場合、肝臓で高発現可能なプロモーターを用いることが好ましい。

異種 P P A R  $\alpha$  をコードする DNA の下流には、遺伝子導入動物において目的とするメッセンジャー RNA の転写を終結させる配列 (ポリアデニレーション (p o l y A) シグナル、ターミネーターとも呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス遺伝子由来、あるいは各種哺乳動物または鳥類の遺伝子由来のターミネーター配列を用いて、効率よい導入遺伝子の発現を達成することができる。好ましくは、シミアンウイルスの S V 4 0 ターミネーターなどが用いられる。その他、目的の遺伝子をさらに高発現させる目的で、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核遺伝子のイントロンの一部を、プロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流に連結することも目的により可能である。

また、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて遺伝子導入動物を作製する場合、上記のベクターは、導入DNAが安定に組み込まれたクローンを選択するための選択マーカー遺伝子（例：ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子）をさらに含むことが好ましい。さらに、  
5 相同組換えにより宿主染色体の特定の部位に導入DNAを組み込むこと（即ち、ノックイン動物の作製）を意図する場合には、上記のベクターは、ランダムな挿入を排除するために、標的部位と相同なDNA配列の外側に単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（HSV-tk）遺伝子やジフテリア毒素遺伝子をネガティブ選択マーカー遺伝子としてさらに含むことが好ましい。こ  
10 れらの実施態様については後で詳述する。

上記のプロモーター、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNA、ターミネーターなどは、適当な制限酵素およびDNAリガーゼ等を用いた通常の遺伝子工学的手法により、上記のベクター中に正しい配置で、即ち遺伝子導入動物において異種PPAR $\alpha$ を発現可能な配置で、挿入することができる。

15 好ましい一実施態様においては、上記のようにして得られる異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを含む発現ベクターは、マイクロインジェクション法により対象となる非ヒト哺乳動物の初期胚に導入される。

対象非ヒト哺乳動物の初期胚は、同種の非ヒト哺乳動物の雌雄を交配させて得られる体内受精卵を採取するか、あるいは同種の非ヒト哺乳動物の雌雄  
20 からそれぞれ採取した卵と精子を体外受精させることにより得ることができる。

用いる非ヒト哺乳動物の齢や飼育条件等は動物種によってそれぞれ異なるが、例えばマウス（好ましくはC57BL/6J（B6）などの近交系マウス、B6と他の近交系とのF<sub>1</sub>など）を用いる場合は、雌が約4～約6週齢、  
25 雄が約2～約8月齢程度のものが好ましく、また、約12時間明期条件（例えば7:00-19:00）で約1週間飼育したものが好ましい。

体内受精は自然交配によってもよいが、性周期の調節と1個体から多数の初期胚を得ることを目的として、雌非ヒト哺乳動物に性腺刺激ホルモンを投与して過剰排卵を誘起した後、雄非ヒト哺乳動物と交配させる方法が好まし

い。雌非ヒト哺乳動物の排卵誘発法としては、例えば初めに卵胞刺激ホルモン（妊馬血清性性腺刺激ホルモン、一般にPMSGと略する）、次いで黄体形成ホルモン（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、一般にhCGと略する）を、例えば腹腔内注射などにより投与する方法が好ましいが、好ましいホルモンの投与量、投与間隔は非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。例えば、  
5 非ヒト哺乳動物がマウス（好ましくはC57BL/6J（B6）などの近交系マウス、B6と他の近交系とのF<sub>1</sub>など）の場合は、通常、卵胞刺激ホルモン投与後、約48時間後に黄体形成ホルモンを投与し、直ちに雄マウスと交配させることにより受精卵を得る方法が好ましく、卵胞刺激ホルモンの投与量は約20～約50IU/個体、好ましくは約30IU/個体、黄体形成ホルモンの投与量は約0～約10IU/個体、好ましくは約5IU/個体である。

一定時間経過後、膣栓の検査等により交配を確認した雌非ヒト哺乳動物の腹腔を開き、卵管から受精卵を取り出して胚培養用培地（例：M16培地、  
15 修正Whitten培地、BWW培地、M2培地、WM-HEPES培地、BWW-HEPES培地等）中で洗って卵丘細胞を除き、微小滴培養法等により5%炭酸ガス/95%大気下でDNA顕微注入まで培養する。直ちに顕微注入を行わない場合、採取した受精卵を緩慢法または超急速法等で凍結保存することも可能である。

20 一方、体外受精の場合は、採卵用雌非ヒト哺乳動物（体内受精の場合と同様のものが好ましく用いられる）に上記と同様に卵胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンを投与して排卵を誘発させた後、卵子を採取して受精用培地（例：TYH培地）中で体外受精時まで微小滴培養法等により5%炭酸ガス/95%大気下で培養する。他方、同種の雄非ヒト哺乳動物（体内受精の場合と同様のものが好ましく用いられる）から精巢上体尾部を取り出し、精子塊を採取して受精用培地中で前培養する。前培養終了後の精子を卵子を含む受精用培地に添加し、微小滴培養法等により5%炭酸ガス/95%大気下で  
25 培養した後、2個の前核を有する受精卵を顕微鏡下で選抜する。直ちにDNAの顕微注入を行わない場合は、得られた受精卵を緩慢法または超急速法等



で凍結保存することも可能である。

受精卵へのDNAの顕微注入は、マイクロマニピュレーター等の公知の装置を用いて常法に従って実施することができる。簡潔に言えば、胚培養用培地の微小滴中に入れた受精卵をホールディングピペットで吸引して固定し、  
5 インジェクションピペットを用いてDNA溶液を雄性もしくは雌性前核、好ましくは雄性前核内に直接注入する。導入DNAはCsCl密度勾配超遠心等で高度に精製したものを用いることが好ましい。また、導入DNAは制限酵素を用いてベクター部分を切断し、直鎖状にしておくことが好ましい。

DNA導入後の受精卵は胚培養用培地中で微小滴培養法等により5%炭酸ガス/95%大気下で1細胞期～胚盤胞期まで培養した後、偽妊娠させた受  
10 胚用雌非ヒト哺乳動物の卵管または子宮内に移植される。受胚用雌非ヒト哺乳動物は移植される初期胚が由来する動物と同種のものであればよく、例えば、マウス初期胚を移植する場合は、ICR系の雌マウス（好ましくは約8～約10週齢）などが好ましく用いられる。受胚用雌非ヒト哺乳動物を偽妊  
15 娠状態にする方法としては、例えば、同種の精管切除（結紮）雄非ヒト哺乳動物（例えば、マウスの場合、ICR系の雄マウス（好ましくは約2月齢以上））と交配させて、膣栓の存在が確認されたものを選択する方法が知られている。

受胚用雌は自然排卵のものを用いてもよいし、あるいは精管切除（結紮）  
20 雄との交配に先立って、黄体形成ホルモン放出ホルモン（一般にLHRHと略する）もしくはその類縁体を投与し、受精能を誘起させたものを用いてもよい。LHRH類縁体としては、例えば、[3,5-DiI-Tyr<sup>5</sup>]-LH-RH、[Gln<sup>8</sup>]-LH-RH、[D-Ala<sup>6</sup>]-LH-RH、[des-Gly<sup>10</sup>]-LH-RH、[D-His(Bzl)<sup>6</sup>]-LH-RH およびそれらの Ethylamide などが挙げられる。LHRHもしくはその類縁体の投与  
25 量、ならびにその投与後に雄非ヒト哺乳動物と交配させる時期は、非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。例えば、非ヒト哺乳動物がマウス（好ましくはICR系のマウスなど）の場合には、通常、LHRHもしくはその類縁体を投与した後、約4日目に雄マウスと交配させることが好ましく、LHRHあるいはその類縁体の投与量は、通常、約10～60μg/個体、好

ましくは約40  $\mu$ g/個体である。

通常、移植される初期胚が桑実胚期以後の場合は受胚用雌の子宮に、それより前（例えば、1細胞期～8細胞期胚）であれば卵管に胚移植される。受胚用雌は、移植胚の発生段階に応じて偽妊娠からある日数が経過したものが適宜使用される。例えばマウスの場合、2細胞期胚を移植するには偽妊娠後約0.5日の雌マウスが、胚盤胞期胚を移植するには偽妊娠後約2.5日の雌マウスが好ましい。受胚用雌を麻酔（好ましくはAvertin、ネンプタール等が使用される）後、切開して卵巣を引き出し、胚培養用培地に懸濁した初期胚（約5～約10個）を胚移植用ピペットを用いて、卵管腹腔口もしくは子宮角の卵管接合部付近に注入する。

移植胚が首尾よく着床し受胚雌が妊娠すれば、自然分娩もしくは帝王切開により仔非ヒト哺乳動物が得られる。自然分娩した受胚雌にはそのまま哺乳を継続させればよく、帝王切開により出産した場合は、産仔は別途用意した哺乳用雌（例えばマウスの場合、通常に交配・分娩した雌マウス（好ましくはICR系の雌マウス等））に哺乳させることができる。

受精卵細胞段階における異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAの導入は、導入DNAが対象非ヒト哺乳動物の生殖系列細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。導入DNAが染色体DNAに組み込まれているか否かは、例えば、産仔の尾部より分離抽出した染色体DNAをサザンハイブリダイゼーションまたはPCR法によりスクリーニングすることにより検定することができる。上記のようにして得られる仔非ヒト哺乳動物（F<sub>0</sub>）の生殖系列細胞において異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAが存在することは、その後代（F<sub>1</sub>）の動物全てが、その生殖系列細胞および体細胞のすべてに異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAが存在することを意味する。

通常、F<sub>0</sub>動物は相同染色体の一方にのみ導入DNAを有するヘテロ接合体として得られる。また、個々のF<sub>0</sub>個体は相同組換えによらない限り異なる染色体上にランダムに挿入される。相同染色体の両方に異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを有するホモ接合体を得るためには、F<sub>0</sub>動物と非トランスジェニック動物とを交雑してF<sub>1</sub>動物を作製し、相同染色体の一方にのみ

導入DNAを有するヘテロ接合体の兄妹同士を交雑すればよい。1遺伝子座にのみ導入DNAが組み込まれていれば、得られるF<sub>2</sub>動物の1/4がホモ接合体となる。

別の好ましい一実施態様においては、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを含む発現ベクターは、エレクトロポレーション法等の公知の遺伝子導入法により対象となる非ヒト哺乳動物のES細胞に導入される。

ES細胞は胚盤胞期の受精卵の内部細胞塊(ICM)に由来し、インビトロで未分化状態を保ったまま培養維持できる細胞をいう。ICMの細胞は将来、胚本体を形成する細胞であり、生殖細胞を含むすべての組織の基になる幹細胞である。ES細胞としては、既に樹立された細胞株ものを用いてもよく、また、EvansとKaufmanの方法(ネイチャー(Nature)第292巻、154頁、1981年)に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスES細胞の場合、現在、一般的には129系マウス由来のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で、例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)から樹立されるES細胞なども良好に用いることができる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これ由来のES細胞は疾患モデルマウスを作製したとき、C57BL/6マウスと戻し交雑することでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

ES細胞の調製は、例えば以下のようにして行うことができる。交配後の雌非ヒト哺乳動物[例えばマウス(好ましくはC57BL/6J(B6)などの近交系マウス、B6と他の近交系とのF<sub>1</sub>など)を用いる場合は、約2月齢以上の雄マウスと交配させた約8~約10週齢程度の雌マウス(妊娠約3.5日)が好ましく用いられる]の子宮から胚盤胞期胚を採取して(あるいは桑実胚期以前の初期胚を卵管から採取した後、胚培養用培地中で上記と同様にして胚盤胞期まで培養してもよい)、適当なフィーダー細胞(例えば

マウスの場合、マウス胎仔から調製される初代繊維芽細胞や公知のSTO繊維芽細胞株等) 層上で培養すると、胚盤胞の一部の細胞が集合して将来胚に分化するICMを形成する。この内部細胞塊をトリプシン処理して単細胞を解離させ、適切な細胞密度を保ち、培地交換を行いながら、解離と継代を繰り返すことによりES細胞が得られる。

ES細胞は雌雄いずれを用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作製するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 $10^6$ 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとして、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、細胞株樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞への遺伝子導入の後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られるES細胞株は、未分化幹細胞の性質を維持するために注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上で、分化抑制因子として知られるLIF(1~10,000 U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス/95%空気または5%酸素/5%炭酸ガス/90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このよう

な継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第 292 巻、154 頁、1981 年 ; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第 78 巻、7634 頁、1981 年 ; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第 87 巻、27 頁、1985 年〕、  
5 本発明の異種 PPAR $\alpha$  をコードする DNA を導入された ES 細胞を分化させて得られる異種 PPAR $\alpha$  発現非ヒト哺乳動物細胞は、インビトロにおける異種 PPAR $\alpha$  の細胞生物学的検討において有用である。

ES 細胞への遺伝子導入には、リン酸カルシウム共沈殿法、電気穿孔 (エレクトロポレーション) 法、リポフェクション法、レトロウイルス感染法、凝集法、顕微注入 (マイクロインジェクション) 法、遺伝子銃 (パーティクルガン) 法、DEAE-デキストラン法などのいずれも用いることができるが、簡便に多数の細胞を処理できること等の点からエレクトロポレーション法が一般的に選択されている。エレクトロポレーションには通常の動物細胞  
15 への遺伝子導入に使用されている条件をそのまま用いればよく、例えば、対数増殖期にある ES 細胞をトリプシン処理して単一細胞に分散させた後、 $10^6 \sim 10^8$  細胞/ml となるように培地に懸濁してキュベットに移し、異種 PPAR $\alpha$  をコードする DNA を含むベクターを  $10 \sim 100 \mu\text{g}$  添加し、 $200 \sim 600 \text{ V/cm}$  の電気パルスを印加することにより行なうことができる。  
20 25

導入 DNA が組み込まれた ES 細胞は、単一細胞をフィーダー細胞上で培養して得られるコロニーから分離抽出した染色体 DNA をサザンハイブリダイゼーションまたは PCR 法によりスクリーニングすることによっても検定することができるが、ES 細胞を用いるトランスジェニック系の最大の長所

は、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子の発現を指標として細胞段階で形質転換体を選択できることである。したがって、ここで使用される導入ベクターは、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを含む発現カセットに加えて、薬剤耐性遺伝子（例：ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II (nptII) 遺伝子、5 ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (hpt) 遺伝子など）やレポーター遺伝子（例： $\beta$ -ガラクトシダーゼ (lacZ) 遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (cat) 遺伝子など）等の選択マーカー遺伝子をさらに含むことが望ましい。例えば、選択マーカー遺伝子として nptII 遺伝子を含むベクターを用いた場合、遺伝子導入処理後のES細胞10 をG418などのネオマイシン系抗生物質を含有する培地中で培養し、出現した耐性コロニーをそれぞれ培養プレートに移してトリプシン処理、培地交換を繰り返した後、一部を培養用として残し、残りをPCRもしくはサザンハイブリダイゼーションにかけて導入DNAの存在を確認する。

導入DNAの組込みが確認されたES細胞を同種の非ヒト哺乳動物由来の15 胚内に戻すと、宿主胚のICMに組み込まれてキメラ胚が形成される。これを仮親（受胚用雌）に移植してさらに発生を続けさせることにより、キメラトランスジェニック動物が得られる。キメラ動物の中でES細胞が将来卵や精子に分化する始原生殖細胞の形成に寄与した場合には、生殖系列キメラが得られることとなり、これを交配することにより導入DNAが遺伝的に固定20 された遺伝子導入非ヒト哺乳動物を作製することができる。

キメラ胚の作製方法としては、桑実胚期までの初期胚同士を接着させて集合させる方法（集合キメラ法）と、胚盤胞の割腔内に細胞を顕微注入する方法（注入キメラ法）とがある。ES細胞によるキメラ胚の作製においては従25 来より後者が広く行なわれているが、最近では、8細胞期胚の透明帯内へのES細胞の注入により集合キメラを作る方法や、マイクロマニピュレーターが不要で操作が容易な方法として、ES細胞塊と透明帯を除去した8細胞期胚とを共培養して凝集させることによって集合キメラを作製する方法も行われている。

いずれの場合も、宿主胚は受精卵への遺伝子導入における採卵用雌として

使用され得る非ヒト哺乳動物から同様にして採取することができるが、例えばマウスの場合、キメラマウス形成へのES細胞の寄与率を毛色（コートカラー）で判定し得るように、ES細胞の由来する系統とは毛色の異なる系統のマウスから宿主胚を採取することが好ましい。例えば、ES細胞が129  
5 系マウス（毛色：アグーチ）由来であれば、採卵用雌としてC57BL/6  
マウス（毛色：ブラック）やICRマウス（毛色：アルビノ）を用い、ES  
細胞がC57BL/6もしくはDBF<sub>1</sub>マウス（毛色：ブラック）由来やT  
T2細胞（C57BL/6とCBAとのF<sub>1</sub>（毛色：アグーチ）由来）であ  
れば、採卵用雌としてICRマウスやBALB/cマウス（毛色：アルビ  
10 ノ）を用いることができる。

また、生殖系列キメラ形成能はES細胞と宿主胚との組み合わせに大きく依存するので、生殖系列キメラ形成能の高い組み合わせを選択することがより好ましい。例えばマウスの場合、129系統由来のES細胞に対してはC  
57BL/6系統由来の宿主胚等を用いることが好ましく、C57BL/6  
15 系統由来のES細胞に対してはBALB/c系統由来の宿主胚等が好ましい。

採卵用雌マウスは約4～約6週齢程度が好ましく、交配用の雄マウスとしては約2～約8月齢程度の同系統のものが好ましい。交配は自然交配によってもよいが、好ましくは性腺刺激ホルモン（卵胞刺激ホルモン、次いで黄体形成ホルモン）を投与して過剰排卵を誘起した後に行なわれる。

20 胚盤注入法による場合は、胚盤胞期胚（例えばマウスの場合、交配後約3.5日）を採卵用雌の子宮から採取し（あるいは桑実胚期以前の初期胚を卵管から採取した後、上述の胚培養用培地中で胚盤胞期まで培養してもよい）、マイクロマニピュレーターを用いて胚盤胞の割腔内に異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAが導入されたES細胞（約10～約15個）を注入した後、偽  
25 妊娠させた受胚用雌非ヒト哺乳動物の子宮内に移植する。受胚用雌非ヒト哺乳動物は受精卵への遺伝子導入における受胚用雌として使用され得る非ヒト哺乳動物を同様に用いることができる。

共培養法による場合は、8細胞期胚および桑実胚（例えばマウスの場合、交配後約2.5日）を採卵用雌の卵管および子宮から採取して（あるいは8

細胞期以前の初期胚を卵管から採取した後、上述の胚培養用培地中で8細胞期または桑実胚期まで培養してもよい) 酸性タイロイド液中で透明帯を溶解した後、ミネラルオイルを重層した胚培養用培地の微小滴中に異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAが導入されたES細胞塊(細胞数約10~約15個)を入れ、さらに上記8細胞期胚または桑実胚(好ましくは2個)を入れて一晚共培養する。得られた桑実胚または胚盤胞を上記と同様にして受胚用雌非ヒト哺乳動物の子宮内に移植する。

移植胚が首尾よく着床し受胚雌が妊娠すれば、自然分娩もしくは帝王切開によりキメラ非ヒト哺乳動物が得られる。自然分娩した受胚雌にはそのまま哺乳を継続させればよく、帝王切開により出産した場合は、産仔は別途用意した哺乳用雌(通常に交配・分娩した雌非ヒト哺乳動物)に哺乳させることができる。

生殖系列キメラの選択は、まずES細胞の雌雄が予め判別されている場合はES細胞と同じ性別のキメラマウスを選択し(通常は雄性ES細胞が使用されるので、雄キメラマウスが選択される)、次いで毛色等の表現型からES細胞の寄与率が高いキメラマウス(例えば、50%以上)を選択する。例えば、129系マウス由来の雄性ES細胞であるD3細胞とC57BL/6マウス由来の宿主胚とのキメラ胚から得られるキメラマウスの場合、アグーチの毛色の占める割合の高い雄マウスを選択するのが好ましい。選択されたキメラ非ヒト哺乳動物が生殖系列キメラであるか否かの確認は、適当な系統の同種動物との交雑により得られるF<sub>1</sub>動物の表現型に基づいて行なうことができる。例えば、上記キメラマウスの場合、アグーチはブラックに対して優性であるので、雌C57BL/6マウスと交雑すると、選択された雄マウスが生殖系列キメラであれば得られるF<sub>1</sub>の毛色はアグーチとなる。

上記のようにして得られる異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAが導入された生殖系列キメラ非ヒト哺乳動物(ファウンダー)は、通常、相同染色体の一方にのみ導入DNAを有するヘテロ接合体として得られる。また、個々のファウンダーは相同組換えによらない限り異なる染色体上にランダムに挿入される。相同染色体の両方に異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを有するホ



モ接合体を得るためには、上記のようにして得られるF<sub>1</sub>動物のうち相同染色体の一方にのみ導入DNAを有するヘテロ接合体の兄妹同士を交雑すればよい。ヘテロ接合体の選択は、例えばF<sub>1</sub>動物の尾部より分離抽出した染色体DNAをサザンハイブリダイゼーションまたはPCR法によりスクリーニングすることにより検定することができる。1遺伝子座にのみ導入DNAが組み込まれていれば、得られるF<sub>2</sub>動物の1/4がホモ接合体となる。

本発明の遺伝子導入動物は、異種PPAR $\alpha$ に対する被験物質の作用を定量的に測定可能な程度に異種PPAR $\alpha$ の発現量が確保される限り、内因性PPAR $\alpha$ の発現については特に制限はない。しかしながら、本発明の遺伝子導入動物を異種PPAR $\alpha$ だけでなく内因性PPAR $\alpha$ にも作用し得る薬剤の評価にも使用する場合は、内因性PPAR $\alpha$ の発現を不活性化することが望ましい。内因性PPAR $\alpha$ の発現が不活性化された本発明の遺伝子導入動物は、公知の方法（例えば、Lee S.S.ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー（Mol. Cell. Biol.）、第15巻、第3012頁、1995年を参照）により選択されるPPAR $\alpha$ 遺伝子がノックアウトされたES細胞、あるいは該ES細胞から上記の方法に従って作製されるPPAR $\alpha$ ノックアウト動物由来の初期胚もしくはES細胞に、上記の方法に従って異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを導入することによって得ることができる。PPAR $\alpha$ 遺伝子をノックアウトする具体的な手段としては、対象非ヒト哺乳動物由来のPPAR $\alpha$ 遺伝子を常法に従って単離し、例えば、そのエキソン部分に他のDNA断片（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子、lacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）等のレポーター遺伝子等）を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか（この場合、前述のように導入DNAの組込みは薬剤耐性やレポーター遺伝子の発現を指標として選択され得る）、Cre-loxP系やFlp-frt系を用いてPPAR $\alpha$ 遺伝子の全部または一部を切り出して該遺伝子を欠失させるか、蛋白質コード領域内へ終止コドン挿入して完全な蛋白質の翻訳を不能にするか、あるいは転写領域内部へ遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、poly

A付加シグナルなど)を挿入して、完全なメッセンジャーRNAの合成を不能にすることによって、結果的に遺伝子を不活性化するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、相同組換えにより対象非ヒト哺乳動物のPPAR $\alpha$ 遺伝子座に組み込ませる方法が好ましく挙げられる。

通常、哺乳動物における遺伝子組換えは大部分が非相同的であり、導入されたDNAは染色体の任意の位置にランダムに挿入される。したがって、薬剤耐性やレポーター遺伝子の発現を検出するなどの選択によっては相同組換えにより標的となる内因性PPAR $\alpha$ 遺伝子にターゲッティングされたクローンのみを効率よく選択することができず、選択されたすべてのクローンについてサザンハイブリダイゼーション法もしくはPCR法による組み込み部位の確認が必要となる。そこで、ターゲッティングベクターの標的配列に相同な領域の外側に、例えば、ガンシクロビル感受性を付与するHSV-tk遺伝子を連結しておけば、該ベクターがランダムに挿入された細胞はHSV-tk遺伝子を有するため、ガンシクロビル含有培地では生育できないが、相同組換えにより内因性PPAR $\alpha$ 遺伝子座にターゲッティングされた細胞はHSV-tk遺伝子を有しないので、ガンシクロビル耐性となり選択される。あるいは、HSV-tk遺伝子の代わりに、例えばジフテリア毒素遺伝子を連結すれば、該ベクターがランダムに挿入された細胞は自身の産生する該毒素によって死滅するので、薬剤非存在下で相同組換え体を選択することもできる。

また、内因性PPAR $\alpha$ の発現が不活性化された本発明の遺伝子導入動物は、このようにして作製される内因性PPAR $\alpha$ をノックアウトされた動物と、上述の異種PPAR $\alpha$ を導入された、該動物と同種の動物とを交配することによっても得ることができる。例えば、内因性PPAR $\alpha$ ホモ欠損マウスと、ヒトPPAR $\alpha$ ホモトランスジェニック(Tg)マウスとを交配して得られる産仔(内因性PPAR $\alpha$ ヘテロ欠損・ヒトPPAR $\alpha$ ヘテロTgマウス)の雌雄同士をさらに交配して、2コピーのヒトPPAR $\alpha$ およびノックアウトされたマウスPPAR $\alpha$ の欠損部分のみが確認されたマウスを選択することにより、内因性PPAR $\alpha$ ホモ欠損・ヒトPPAR $\alpha$ ホモTgマウス

を作製することができる。

あるいは、内因性 PPAR $\alpha$  の発現が不活性化された本発明の遺伝子導入動物は、相同組換えを用いた遺伝子ターゲティングにより異種 PPAR $\alpha$  をコードする DNA で内因性 PPAR $\alpha$  遺伝子を置換したノックイン動物であつてもよい。

ノックイン動物はノックアウト動物と基本的に同様の手法に従って作製することができる。PPAR $\alpha$  の ORF は第 3 エキソン～第 8 エキソンに存在するので、例えば、対象非ヒト哺乳動物由来の PPAR $\alpha$  遺伝子のこれらの領域を適当な制限酵素を用いて切除し、代わりに異種 PPAR $\alpha$  遺伝子の対応する領域を挿入することにより得られる DNA を含むターゲティングベクターを、上記の方法に従って対象非ヒト哺乳動物由来の ES 細胞に導入し、相同組換えにより該動物の内因性 PPAR $\alpha$  遺伝子座に異種 PPAR $\alpha$  をコードする DNA が組み込まれた ES 細胞クローンを選択すればよい。クローン選択は PCR 法やサザン法を用いて行なうこともできるが、例えば、ターゲティングベクターの PPAR $\alpha$  遺伝子の 3' 非翻訳領域などにネオマイシン耐性遺伝子等のポジティブ選択用マーカー遺伝子を挿入し、さらに標的配列と相同な領域の外側に HSV-1k 遺伝子やジフテリア毒素遺伝子等のネガティブ選択用マーカー遺伝子を挿入すれば、薬剤耐性を指標にして相同組換え体を選択することができる。

また、ポジティブ選択用マーカー遺伝子が導入された異種 PPAR $\alpha$  の発現を妨げる場合があるので、ポジティブ選択用マーカー遺伝子の両端に loxP 配列もしくは frt 配列を配したターゲティングベクターを用い、相同組換え体選択後の適当な時期に Cre もしくは Flp リコンビナーゼまたは該リコンビナーゼ発現ベクター（例：アデノウイルスベクターなど）を作用させることにより、ポジティブ選択用マーカー遺伝子を切り出すことが好ましい。あるいは、Cre-loxP 系や Flp-frt 系を用いる代わりに、ポジティブ選択用マーカー遺伝子の両端に標的配列と相同な配列を同方向に繰り返して配置し、該配列間での遺伝子内組換えを利用してポジティブ選択用マーカー遺伝子を切り出してもよい。

本発明の遺伝子導入動物は、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを発現可能な状態で安定に保持することに加えて、1以上の他の遺伝子改変を有することをさらなる特徴とする。「他の遺伝子改変」とは、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAが導入される以外の遺伝子改変を意味し、自然突然変異により

5 内因性遺伝子が改変された自然発症疾患モデル動物、他の遺伝子をさらに導入されたトランスジェニック動物、内因性遺伝子を不活化されたノックアウト動物（挿入突然変異等による遺伝子破壊のほか、アンチセンスDNAや中和抗体をコードするDNAの導入により遺伝子発現が検出不可能もしくは無視し得る程度にまで低下したトランスジェニック動物を含む）、変異内因性

10 遺伝子が導入されたドミナントネガティブ変異体などが含まれる。したがって、内因性PPAR $\alpha$ 遺伝子の改変もまた、本発明における「他の遺伝子改変」に該当する。

「他の遺伝子改変」は、異種PPAR $\alpha$ に特異的な作動薬もしくは拮抗薬の薬効評価用としての本発明の遺伝子導入動物の用途に有利なものであれば

15 特に制限はないが、例えば、PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせるような遺伝子改変であることが好ましい。

「PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患」とは、PPAR $\alpha$ 活性の異常に起因するかもしれない結果的にPPAR $\alpha$ 活性の異常を生じる疾患だけでなく、PPAR $\alpha$ 活性を調節することにより予防および/または治療効果が得られ

20 得る疾患をも含めた概念として把握されるべきである。例えば、PPAR $\alpha$ を活性化することにより予防・治療可能な疾患として、高脂血症、高トリグリセリド（TG）血症、混合型脂質異常症、低HDL血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、壊疽、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血性心不全、不安定狭心症、PTCA（経皮的冠動脈内腔拡張術）後の再狭窄、ステント留置後の再狭窄、高フィブリノーゲン血症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、アルツハイマー病、貧血性低酸素症および性腺障害等が、PPAR $\alpha$ を阻害することによ

25

り予防・治療可能な疾患として、肝臓癌、乳癌および子宮内膜炎等がそれぞれ挙げられる。

- 「PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる1以上の他の遺伝子改変を有する疾患モデル」としては、例えば、高脂血症もしくは動脈硬化症モデルとしてWHHLウサギ（低比重リポ蛋白レセプター（LDLR）に変異を有する；Watanabe Y.、アテロースクレロシス（Atherosclerosis）、第36巻、第261頁、1980年）、SHLM（apoE欠損変異を有する自然発症マウス；Matsushima Y.ら、マンマリアン・ゲノム（Mamm. Genome）、第10巻、第352頁、1999年）、LDLRノックアウトマウス（Ishibashi S.ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インヴェスティゲーション（J. Clin. Invest.）、第92巻、第883頁、1993年）、apoEノックアウトマウス（Piedrahita J.A.ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシース・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、第89巻、第4471頁、1992年）、ヒト apo A, ヒト apoB ダブルトランスジェニックマウス（Callow M.J.ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシース・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、第91巻、第2130頁、1994年）等が、虚血性心疾患モデルとして CD55 CD59 ダブルトランスジェニックマウス（Cowan P.J.ら、Xenotransplantation、第5巻、第184-90頁、1998年）等が、皮膚炎モデルとして interleukin 1 トランスジェニックマウス（Groves R.W. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第92巻、11874頁、1995年）等が、免疫不全モデルとして CD19 ノックアウトマウス（Spielman J.ら、Immunity、第3巻、39頁、1995年）等が、低血糖モデルとして SPC2 ノックアウトマウス（Furuta M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第94巻、6646頁、1997年）等が、脂肪肝モデルとして ob/ob マウス（Herberg L. 及び Coleman D.L.、メタボリズム（Metabolism）、第26巻、第59頁、1977年）、KK マウス（Nakamura M. 及び Yamada K.、ダイアベトロジー（Diabetologia）、第3巻、第212頁、1967頁）、FLS マウス（Soga M.ら、ラボラトリー・オブ・アニマル・サイエンス（Lab. Anim. Sci.）、第49巻、第269頁、1999年）、糖尿病モデル

として NOD マウス (Makino S. ら、エクスペリメンタル・アニマル (Exp. Anim.)、第 29 巻、第 1 頁、1980 年)、BB ラット (Crisa L. ら、ダイアビ  
ーティス・メタボリズム・レビュー (Diabetes Metab. Rev.)、第 8 巻、第  
4 頁、1992 年)、ob/ob マウス、db/db マウス (Hummel L. ら、サイエンス  
5 (Science)、第 153 巻、第 1127 頁、1966 年)、KK マウス、GK ラット  
(Goto Y. ら、トウホク・ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディ  
シン (Tohoku J. Exp. Med.)、第 119 巻、第 85 頁、1976 年)、Zucker  
fatty ラット (Zucker L.M. ら、アニュアル・オブ・ニューヨーク・アカデミ  
ー・オブ・サイエンス (Ann. NY Acad. Sci.)、第 131 巻、第 447 頁、1965  
10 年)、OLETF ラット (Kawano K. ら、ダイアビーティス (Diabetes)、第 41  
巻、第 1422 頁、1992 年) 等が、肥満モデルとして ob/ob マウス、db/db マ  
ウス、KK マウス、Zucker fatty ラット、OLETF ラット等が、アルツハイマー  
病モデルとして変異アミロイド前駆体蛋白質遺伝子導入マウス等が、貧血性  
低酸素症モデルとして beta SAD (beta S-Antilles-D Punjab) トランスジェ  
15 ニックマウス (Trudel M. ら、EMBO J、第 10 巻、3157 頁、1991 年) 等が、  
性腺障害モデルとして Steroidogenic factor 1 ノックアウトマウス (Zhao  
L. ら、Development、第 128 巻、147 頁、2001 年) 等が、肝臓癌モデルとし  
て p53 ノックアウトマウス (Kemp C.J. Molecular Carcinogenesis、第 12  
巻、132 頁、1995 年) 等が、乳癌モデルとして c-neu トランスジェニックマ  
20 ウス (Rao G.N. ら、Breast Cancer Res Treat、第 48 巻、265 頁、1998 年)  
等が、子宮内膜炎モデルとして perforin Fas-ligand ダブルノックアウトマ  
ウス (Spielman J. ら、J Immunol.、第 161 巻、7063 頁、1998 年) 等が、  
知られている。

これらの「他の遺伝子改変を有する疾患モデル」は、例えば、米国の  
25 Jackson 研究所などから購入可能であるか、あるいは周知の遺伝子改変技術  
を用いて容易に作製することができる。

本発明の遺伝子導入動物は、「PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同  
一もしくは類似の病態を生じさせる 1 以上の他の遺伝子改変」に加えて、同  
一もしくは他の疾患モデルを作製し得る非遺伝的処理を施されていてもよい。

「非遺伝的処理」とは対象非ヒト哺乳動物における遺伝子改変を生じさせない処理を意味する。このような処理としては、例えば、高脂肪食負荷処理、糖負荷処理、飢餓処理、血管結紮／再灌流等が挙げられる。

5 PPAR $\alpha$ は哺乳動物の肝臓、心臓、腎臓、副腎、消化管、脳などで高発現しており、それらの臓器における疾患と関連している。従って、本発明の遺伝子導入動物は、肝臓、心臓、腎臓、副腎、消化管および脳のうちの1もしくは2以上の部位で異種PPAR $\alpha$ を特異的に発現するものであることが好ましい。そのような部位特異的発現は、前記した標的組織で異種PPAR $\alpha$ を特異的もしくは高発現させ得るプロモーターを用いることにより達成す  
10 ることができる。例えば、肝臓で高発現可能な血清アミロイドPコンポーネント（SAP）プロモーターを用いることにより、異種PPAR $\alpha$ を肝臓特異的に、あるいは肝臓で高発現する本発明の遺伝子導入動物を作製することができる。

また、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを導入された非ヒト哺乳動物が  
15 PPAR $\alpha$ を著しく高発現する場合、他の遺伝子改変を有することなく肝臓癌、乳癌、子宮内膜炎などの疾患を発症する表現型を示すものがある。したがって、本発明はまた、肝臓癌、乳癌および子宮内膜炎からなる群より選択される1以上の疾患を発症する、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを導入された非ヒト哺乳動物を提供する。

20 異種PPAR $\alpha$ に特異的な作動薬もしくは拮抗薬の薬効評価用としての本発明の遺伝子導入動物の用途に有利な「他の遺伝子改変」の別の好ましい態様としては、PPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAの導入が挙げられる。上述のように、PPAR $\alpha$ はリガンド存在下に標的遺伝子の5'上流に存在するPPRE配列に結合して該遺伝子の転写を促進する  
25 （遺伝子によっては抑制する場合もある（例：apoC-III等））。したがって、PPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAを導入された非ヒト哺乳動物では、該DNAの発現に及ぼす被験物質の効果を検定することにより、該物質のアゴニストまたはアンタゴニスト活性を評価することができる。ここで「外来DNA」とは、外部より人為的に遺伝子導入されたDNA

を意味し、異種DNAだけでなく同種DNAをも包含する。「PPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNA」としては、PPAR $\alpha$ の本来の標的遺伝子であり、PPRE配列をプロモーター領域に内在するヒトまたは他の哺乳動物由来遺伝子（ゲノムDNA）、例えば、CYP4A11、CYP7A1、  
5 PAI-1、ApoA-I、ApoA-II、ApoC-III、Acyl-CoA等の遺伝子が挙げられる。あるいは、これらの遺伝子由来のPPRE配列を含む任意のプロモーター（対象非ヒト哺乳動物の細胞内で機能的である）の下流に適当なりポーター遺伝子（例： $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、  
10 ペルオキシダーゼ遺伝子等）を連結したキメラDNAもまた好ましい。

異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを導入された非ヒト哺乳動物に、PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる1以上の他の遺伝子改変、あるいはPPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAを導入する方法は特に制限はなく、例えば、異種PPAR $\alpha$   
15 をコードするDNAを導入された非ヒト哺乳動物と、PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる1以上の他の遺伝子改変、あるいはPPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAを有する同種の非ヒト哺乳動物とを交雑する方法；PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる1以上の他の遺伝子改変、  
20 あるいはPPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAを有する非ヒト哺乳動物の初期胚やES細胞に、上述の方法により異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを導入してトランスジェニック動物を得る方法；異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを導入された非ヒト哺乳動物の初期胚やES細胞に、上述の方法により、あるいはノックアウト技術により、PPAR $\alpha$ の活  
25 性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる1以上の他の遺伝子改変、あるいはPPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAを導入する方法等が挙げられる。また、PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる1以上の他の遺伝子改変が外来遺伝子やドミナント変異遺伝子の導入による場合、野生型非ヒト哺乳動物



の初期胚やES細胞に、該外来遺伝子等と異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAとを同時にもしくは順次導入してトランスジェニック動物を得てもよい。他の遺伝子改変がPPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAの導入である場合も同様に、該外来DNAと異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAとを同時にもしくは順次導入してトランスジェニック動物を得ることができる。さらに、PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる1以上の他の遺伝子改変が内因性遺伝子の破壊による場合は、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを破壊すべき内因性遺伝子にターゲティングされ得るようにデザインして野生型非ヒト哺乳動物のES細胞に導入してもよい。この場合、ターゲティングベクターは、内因性PPAR $\alpha$ 遺伝子を破壊されるべき内因性遺伝子に置き換える以外は、上記のノックイン動物の作製に関して例示したものが好ましく使用され得る。

異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを導入された非ヒト哺乳動物と、PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせる1以上の他の遺伝子改変（あるいはPPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNA）を有する同種の疾患モデル非ヒト哺乳動物とを交雑する場合、ホモ接合体同士を交雑することが望ましい。例えば、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAが1遺伝子座に組み込まれたホモ接合体と、apoE ホモ欠損高脂血症（動脈硬化）モデルとを交雑して得られるF<sub>1</sub>は両遺伝子についてヘテロである。このF<sub>1</sub>同士を兄妹交配して得られるF<sub>2</sub>個体の1/16は異種PPAR $\alpha$ ホモ導入・apoE ホモ欠損となる。

上記のようにして得られる「本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物」は、内因性PPAR $\alpha$ に加えて（あるいはそれに代えて）異種PPAR $\alpha$ を発現するので、異種PPAR $\alpha$ に対してアゴニストまたはアンタゴニスト活性を有するが、内因性PPAR $\alpha$ に対しては活性を有しない異種PPAR $\alpha$ 特異的作動薬または拮抗薬について、その薬効をインビボで評価することを可能にする。したがって、本発明は、本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物またはその生体の一部に被験物質を適用し、該物質の異種PPAR $\alpha$ に対するアゴニストまたはアンタゴニスト活性を検定することを特徴とする異種PPAR $\alpha$ 作

動薬または拮抗薬のスクリーニング方法を提供する。

ここで「アゴニスト活性」とは、PPAR $\alpha$ に特異的に結合し、PPAR $\alpha$ の活性型（即ち、RXRとのヘテロダイマーとしてPPREに結合し、標的遺伝子の転写を活性化し得る状態）と不活性型の平衡状態をより活性側にシフトさせる性質をいい、その程度は特に限定されない。従って、「アゴニスト活性を有する物質（作動薬）」には、いわゆるフルアゴニストの他、パーシャルアゴニストも包含される。一方、「アンタゴニスト活性」とは、PPAR $\alpha$ のリガンド結合部位に拮抗的に結合するが、活性型と不活性型の平衡状態にほとんど又は全く影響を及ぼさない性質、あるいはPPAR $\alpha$ の任意の部位に結合して、PPAR $\alpha$ の活性型と不活性型の平衡状態をより不活性側にシフトさせる性質をいう。従って、本明細書において「アンタゴニスト活性を有する物質（拮抗薬）」とは、いわゆるニュートラルアンタゴニストとインバースアゴニストの両方を包含する概念として定義されるものとする。

具体的には、本発明のスクリーニング方法では、本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物に被験物質を投与する。被験物質としては、公知の合成化合物、ペプチド、タンパク質、DNAライブラリーなどの他に、例えば哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。該被験物質は、本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物の内因性PPAR $\alpha$ および異種PPAR $\alpha$ のそれぞれとインビトロでの結合実験を行なって異種PPAR $\alpha$ のみに結合することを確認するか、あるいは、PPREの制御下に置かれたレポーター遺伝子をそれぞれ導入した非ヒト哺乳動物由来細胞および異種哺乳動物由来細胞における発現アッセイを行なって、後者でのみレポーター遺伝子の発現が活性化されることを確認することなどにより、予め異種PPAR $\alpha$ 特異的に作用することを確認しておくことが望ましい。本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物において内因性PPAR $\alpha$ がロックアウトされている場合は、この予備スクリーニングを省略することができる。

被験物質のPPAR $\alpha$ アゴニスト／アンタゴニスト活性は、例えば、脂肪

酸 $\beta$ 酸化活性またはそれに伴う血中TG濃度の変化、apoC-III産生またはそれに伴う血中TG濃度の変化、apoA-I産生またはそれに伴う血中HDL-C濃度の変化、apoA-II産生またはそれに伴う血中HDL-C濃度の変化などを指標として検定することができる。これらは自体公知の方法、例えば、

5 Chung, B.H., Segrest, J.P., Ray, M.J., Brunzell, J.D., Hokanson, J.E., Krauss, R.M., Beaudrie, K., and Cone, J.T. 1986. Methods Enzymol. 128: 181-209 に記載の方法に準じて測定することができる。「他の遺伝子改変」が「PPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAの導入」である本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物においては、該外来D

10 NAの発現を調べることによって、被験物質のPPAR $\alpha$ アゴニスト/アンタゴニスト活性を容易に測定することができる。

このようにして選択された異種PPAR $\alpha$ 作動薬は、該異種PPAR $\alpha$ の由来する動物における安全で低毒性な高脂血症、高トリグリセリド血症、混合型脂質異常症、低HDL血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、

15 壊疽、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血性心不全、不安定狭心症、PTCA後の再狭窄、ステント留置後の再狭窄、高フィブリノーゲン血症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、

20 アルツハイマー病、貧血性低酸素症および性腺障害などの疾患の予防・治療薬として使用することができる。

異種PPAR $\alpha$ 作動薬は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液

25 剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。該作動薬は、生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。これら製剤における有効成分量は後述する投与量を考慮して適宜選択される。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

また、異種 PPAR $\alpha$  作動薬が DNA、RNA などの核酸である場合、当該核酸を単独で、あるいは当該 DNA（または当該 RNA に対応する DNA）をレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは他の哺乳動物に投与することができる。当該核酸は、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認め

られる担体とともに製剤化した後、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、異種 PPAR $\alpha$  と同一もしくは実質的に同一の PPAR $\alpha$  を有する哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、  
5 ウマ、ネコ、イヌ、サルなど；「実質的に同一」とは上記と同義である）、好ましくは異種 PPAR $\alpha$  の由来する動物（好ましくはヒト）に対して投与することができる。

異種 PPAR $\alpha$  作動薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなど  
10 により異なるが、例えば、高 TG 血症の治療目的で経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg）においては、一日につき約 0.1 mg ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口投与の場合、当該作動薬の投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、高 TG 血症の治療目的で注射剤として成人（体  
15 重 60 kg）に投与する場合、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

また、本発明のスクリーニング法により選択された異種 PPAR $\alpha$  拮抗薬  
20 は、哺乳動物（好ましくは異種 PPAR $\alpha$  の由来する動物、さらに好ましくはヒト）における安全で低毒性な肝臓癌、乳癌または子宮内膜炎などの疾患の予防・治療薬として使用することができる。異種 PPAR $\alpha$  拮抗薬は、上記異種 PPAR $\alpha$  作動薬と同様の方法により製剤化され、経口的もしくは非経口的に哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、  
25 ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど；「実質的に同一」とは上記と同義である）に投与することができる。

異種 PPAR $\alpha$  拮抗薬の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、肝臓癌の治療目的で経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg）においては、一日につき約 0.1 mg ~ 100 mg、

好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口投与の場合、当該拮抗薬の投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、肝臓癌の治療目的で注射剤として成人（体重60kg）に投与する場合、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

「本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物」はPPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態を示すので、該動物に被験物質を投与してその病態に及ぼす該物質の効果を検定することによって、異種PPAR $\alpha$ の由来する哺乳動物（好ましくは、ヒト）における該PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患に対して予防・治療活性を有する物質をスクリーニングすることができる。指標となる病態は疾患モデルの種類に応じて適宜選択され得るが、例えば、本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物が高脂血症モデルであれば、血中コレステロール濃度（総コレステロール濃度、TG濃度、HDL-C濃度等）の改善など、動脈硬化モデルであれば動脈硬化病変の退縮など、虚血性心疾患や脳血管疾患のモデルであれば血流の改善など、肝臓癌や乳癌のモデルであれば癌病巣の退縮などをそれぞれ指標として、被験物質の疾患予防・治療効果を評価することができる。

上述のように、異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを導入された非ヒト哺乳動物がPPAR $\alpha$ を著しく高発現する場合、他の遺伝子改変を有することなく肝臓癌、乳癌、子宮内膜炎などの疾患を発症する表現型を示すものがある。したがって、このような異種PPAR $\alpha$ 導入非ヒト哺乳動物に同様に被験物質を投与して上記疾患の病態改善効果を検定することによっても、該疾患の予防・治療活性を有する物質をスクリーニングすることができる。

このようにして選択された物質は、安全で低毒性な高脂血症、高トリグリセリド血症、混合型脂質異常症、低HDL血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、間欠性跛行、壊疽、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血性心不全、不安定狭心症、PTCA後の再狭窄、ステント留置

- 後の再狭窄、高フィブリノーゲン血症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、アルツハイマー病、貧血性低酸素症、性腺障害、肝臓癌、乳癌および子宮内膜炎などの疾患の予防・治療薬として使用することができる。選択された物質は、上記異種PPAR $\alpha$ 作動薬と同様の方法により製剤化され、経口的もしくは非経口的に哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に投与することができる。
- 10 選択された物質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、高TG血症の治療目的で経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口投与の場合、当該物質の投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、高TG血症の治療目的で注射剤として成人（体重60kg）に投与する場合、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度である。投与対象がヒト以外の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。
- 15 本発明の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。
- 〔配列番号：1〕ヒトPPAR $\alpha$ をコードするcDNAの塩基配列を示す。
- 〔配列番号：2〕ヒトPPAR $\alpha$ のアミノ酸配列を示す。
- 〔配列番号：3〕ヒトSAPプロモーターを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。
- 25 〔配列番号：4〕ヒトSAPプロモーターを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。
- 〔配列番号：5〕ウサギ $\beta$ -グロビンエンハンサーを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。
- 〔配列番号：6〕ウサギ $\beta$ -グロビンエンハンサーを増幅するためのプラ

イマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕ヒトPPAR $\alpha$  cDNAフラグメントを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

- 5      〔配列番号：8〕ヒトPPAR $\alpha$  cDNAフラグメントを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

- 10      〔配列番号：9〕PCRにより増幅されたヒトPPAR $\alpha$  cDNAフラグメントを検出するための蛍光発生プローブとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

本願明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次に挙げる。

	DNA	: デオキシリボ核酸
15	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
20	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
25	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン



	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
5	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
10	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
15	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
20	p G l u	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
25	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

#### 実施例1 PPAR $\alpha$ ベクター構築

肝臓での導入遺伝子の高発現に必要な hSAP (human serum amyloid P component) プロモーターを PCR によりクローニングした。GENBANK ヒトゲノムデータより hSAP は第一番染色体上に存在することが公知である。cDNA 配列とのホモロジーサーチにより 5' 上流域が特定できたため、文献 (J. Biol. Chem., 111, 736, 1992; Dev. Genet., 10, 336, 1989) で使用されている  
5 プロモーター領域のゲノム配列をもとにプライマー SA1 (5' - ACTGAGTAGAAGTAGCAGAA-3' (配列番号: 3)) および SA4 (5' - CAGCGGCTTGTTTCATATTCC-3' (配列番号: 4)) を設計し、開始コドンに隣接する HindIII-AvrII 断片 0.67Kbp を、PCR (宝酒造: Ex Taq DNA polymerase  
10 使用; 94℃、2 分間処理後、94℃、0.5 分、60℃、0.5 分、68℃ 1 分を 30 サイクル) で増幅し、得られた断片を pCR2.1 ベクター (invitrogen 社) に TA cloning (invitrogen 社) 法にてクローニングしてシーケンスの確認を行った。4 クローンの解析を行い、塩基置換のないクローン 1 個を取得した (プラスミド名: pCR2.1-SA4)。

15 次に、宿主哺乳動物細胞における高発現に必要な rabbit  $\beta$ -globin エンハンサーのクローニングを以下の方法で行った。ウサギの血液より調製したゲノム DNA を鋳型にし、5' 末端に発現ベクター構築用の制限酵素サイトを付加したプライマー BG2 (5' -TCCTAGGTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTG-3' (配列番号: 5)) ; AvrII サイトが付加されたもの) および BG3 (5' -  
20 CGGTACCTTTGCCAAAATGATGAGACAGC-3' (配列番号: 6)) ; KpnI サイトが付加されたもの) を用いて PCR (宝酒造: Ex Taq DNA polymerase 使用; 94℃、2 分間処理後、94℃、0.5 分、60℃、0.5 分、72℃ 1 分を 30 サイクル) を行ない、増幅されたエンハンサー領域約 640bp を得た。増幅断片を pCR2.1-TOPO ベクターに TA cloning (invitrogen 社) し、8 クローンについてシーケンス  
25 の確認 (ABI 社 BigDye Terminator 使用) を行った。8 クローンのシーケンス解析結果をエンハンサー配列と比較した結果、ほぼ既知の配列と一致したので PCR テンプレートのウサギゲノム由来のものであると判断された。

PPAR  $\alpha$  cDNA は pMCMV-neo-hPPAR  $\alpha$  (Biochem. Biophys. Res. Commun., 278: 704-711 (2000)) より切り出した 1.4Kbp KpnI-SalI 断片を使用した。

SV40 polyA は pTB399 (R. Sasada ら、Cell Structure and Function, 12 : 205, 1987) 由来の polyA 付加シグナルを含む BglII から HindIII までの断片を pSP73 (stratagene 社) にクローニングし、BglII サイトに SalI リンカーを付与後、0.27Kbp の SalI-HindIII 断片として使用した。

- 5 発現ベクターの構築にあたり、最初 pCR2.1-SA4 の AvrII-KpnI サイトに pCR2.1-enh5 より回収した AvrII-KpnI 断片を Takara ligation kit (宝酒造) を用いてライゲーションし、プロモーターとエンハンサーが入った pCR2.1-SAPENH1 を作製した。一方、pBluescriptII KS- (stratagene) の KpnI-HindIII サイトに pMCMV-neo-hPPAR $\alpha$  より調製した約 1.4Kbp の hPPAR $\alpha$
- 10 cDNA と約 0.27Kbp の SV40 polyA 断片 (R. Sasada ら、Cell Structure and Function, 12 : 205, 1987) をライゲーションし、cDNA と polyA が入った pKS-PPARpolyA1 を作製した。その後、pBluescriptII KS- (stratagene) の NotI サイトに pCR2.1-SAPENH1 より回収した NotI-KpnI 断片 (約 1.3Kbp) と pMCMV-neo-hPPAR $\alpha$  より回収した KpnI-NotI 断片 (約 1.7Kbp) をライゲーションし、発現ベクターの構築を完了した (プラスミド名 : pKS-SEPP2 ; 本
- 15 プラスミドを大腸菌 JM109 株にクローニングした形質転換体 (Escherichia coli JM109/pKS-SEPP2) は FERM BP-8151 の受託番号を付され、平成14年8月14日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6) に寄託されている。 ) 。
- 20 トランスジェニックマウス作製のため使用されるインジェクション断片は NotI 切断により切り出され、サイズは約 3.0Kbp である (図1) 。

## 実施例2 ヒト PPAR $\alpha$ を導入したトランスジェニックマウスの作製

- 25 採卵用雌マウス (C57BL/6J 系統、9~13 週齢) に 5IU の PMSG を腹腔内投与し、12 時間明期/12 時間暗期の飼育室で 2 日間飼育後、5IU の hCG を腹腔内投与して雄マウス (C57BL/6J 系統、15~20 週齢) と交配させた。別途、自然発情している受胎用雌マウス (ICR 系統、9~20 週齢) を精管結紮雄マウス (ICR 系統、15~20 週齢) と交配させた。翌日、膣栓形成により交尾を確認した採卵用雌マウスの腹腔を開いて卵管を取り出し、M2 培地中、実体顕

微鏡下にピンセットで受精卵を取り出した。卵丘細胞がとれた受精卵をピペットで吸い上げ、ミネラルオイルで覆われた M16 培地のドロップ中に入れて、インジェクションするまでの間 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で 2 時間培養した。

5 受精卵をミネラルオイルで覆われた M2 培地のドロップ中に入れてホールディングピペットで吸引固定した。実施例 1 で調製したインジェクション断片溶液 (0.3~1.0 μg/ml) をインジェクションピペットに吸引し、実体顕微鏡下にインジェクションピペットを受精卵の雄性前核に突き刺し、インジェクション断片を注入した。インジェクション終了後、受精卵をミネラルオイルで覆われた M2 培地のドロップ中に入れて、受胎用雌への移植までの間  
10 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

膈栓形成により偽妊娠状態を確認した受胎用雌マウスをネブタールで麻酔後、後背部を切開して脂肪塊をピンセットで摘んで引き出し、クレンメで固定した。実体顕微鏡下に卵巣嚢をピンセットで引き裂き、各卵管当たり 10~15 個の受精卵をトランスファーピペットを用いて卵管開口部に注入した。  
15 卵巣と卵管を体内に戻して切り口を縫合した後、12 時間明期/12 時間暗期の飼育室で飼育を続けた。胚移植から 21 日後に仔マウス (F<sub>0</sub>) が産まれた。仔マウスへの導入 DNA の伝達は、尾部を 1cm 程度ハサミで切り取り、該組織抽出液から常法により DNA を単離して PCR 法により確認した。

導入 DNA の伝達を確認された F<sub>0</sub> 個体は、生殖可能になった段階で  
20 C57BL/6J マウスと交配させて産仔 (F<sub>1</sub>) を得た。上記と同様に導入 DNA の伝達を確認し、導入 DNA を有する F<sub>1</sub> 個体同士を (兄妹) 交配させ、導入 DNA に関してホモ接合体を得た。

### 実施例 3 トランスジェニックマウスの遺伝子発現解析

25 実施例 2 において得られたトランスジェニックマウスのヒト PPAR $\alpha$  の発現程度を調べるため、得られた 5~6 週齢トランスジェニックマウスから肝臓を採取し、アイソジェン (ニッポンジーン社製) を使用して total RNA を抽出した。次に、RNase-free DNase set (キアゲン社製) および RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) により精製した total RNA をもとにキット TaqMan

Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いた逆転写反応により cDNA を調製した。Real-time PCR (TaqMan PCR) のためのプライマーとしては 5' -CGCCAGCACGGACGA-3' (配列番号: 7) および 5' -TTGTCCCCACATATTCGACACTC-3' (配列番号: 8) を用い、FAM (fluorescent 5-carboxyfluorescein) 標識 TaqMan プローブとしては 5' -CCCCCGGCAGTGCCCTGAA-3' (配列番号: 9) を用いた。さらに TaqMan PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、専用プレート中で各 20  $\mu$ l の cDNA サンプルを鋳型として Real-time PCR 反応を行った。反応は、PCR 装置 7700 シーケンスディテクター (アプライドバイオシステムズ社製) により、50°C、2 分間; 95°C、10 分間処理後、95°C、15 秒; 60°C、1 分のサイクルを 40 回行った。反応後、解析マニュアルに従ってデータ解析を行った。以上の定量の標準として同じ cDNA サンプルを用いて TaqMan Rodent GAPDH Control Reagent (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて GAPDH 遺伝子発現の定量を行ってデータ値補正に用いた。実験の結果、トランスジェニックマウスの肝臓においてヒト PPAR  $\alpha$  の発現が確認された。

#### 実施例 4 PPAR $\alpha$ ホモ欠損マウスとの交配

実施例 2 において作製されたヒト PPAR  $\alpha$  ホモ Tg マウスと PPAR  $\alpha$  ホモ欠損マウス (Jackson 研究所、米国) とを交配させて産仔を得る。マウス産仔の尾から DNA を抽出してサザン解析を行ない、ヒト PPAR  $\alpha$  およびノックアウトされたマウス PPAR  $\alpha$  遺伝子欠損部分が全ての産仔から検出された親マウスを、ヒト PPAR  $\alpha$  ヘテロ Tg マウス PPAR  $\alpha$  ヘテロ欠損マウスとして選択する。次にその雌雄同士を交配させる。遺伝子判定を同様の方法で行ってヒト PPAR  $\alpha$  が 2 コピーおよびノックアウトされたマウス PPAR  $\alpha$  遺伝子の欠損部分のみが確認されるマウスをヒト PPAR  $\alpha$  ホモ Tg マウス PPAR  $\alpha$  ホモ欠損マウスとして選択する。

#### 実施例 5 各種高脂血症 (動脈硬化) モデルマウスとの交配

##### (1) apoE ホモ欠損マウスとの交配

実施例 2 において作製されたヒト P P A R  $\alpha$  ホモ Tg マウスと高脂血症（動脈硬化）疾患モデルである apoE ホモ欠損マウス（Jackson 研究所、米国；C57BL/6J を遺伝的背景とする）とを交配させて得られる産仔の雌雄同士を交配させる。得られるマウス産仔の尾から上記と同様にして DNA を抽出してサザン解析を行ない、ヒト P P A R  $\alpha$  の DNA およびノックアウトされた apoE 遺伝子が全ての産仔から検出された親マウスを、ヒト P P A R  $\alpha$  ヘテロ Tg  $\cdot$  apoE ヘテロ欠損マウスとして選択する。次にその雌雄同士を交配させる。遺伝子判定を同様の方法で行ってヒト P P A R  $\alpha$  が 2 コピーおよびノックアウトされた apoE 遺伝子の欠損部分のみが確認されたマウスをヒト P P A R  $\alpha$  ホモ Tg  $\cdot$  apoE ホモ欠損マウスとして選択する。

(2) LDL 受容体ホモ欠損マウスとの交配

実施例 2 において作製されたヒト P P A R  $\alpha$  ホモ Tg マウスと高脂血症（動脈硬化）疾患モデルである LDL 受容体ホモ欠損マウス〔武田薬品工業株式会社において作製されたマウス（特開平 10-56915 号公報に記載）、あるいは Jackson 研究所で保存されているマウス、米国；いずれも C57BL/6J を遺伝的背景とする〕とを交配させて産仔を得る。得られるマウス産仔の尾から上記と同様にして DNA を抽出してサザン解析を行ない、ヒト P P A R  $\alpha$  の DNA およびノックアウトされた LDL 受容体遺伝子が全ての産仔から検出された親マウスを、ヒト P P A R  $\alpha$  ヘテロ Tg  $\cdot$  LDL 受容体ヘテロ欠損マウスとして選択する。次にその雌雄同士を交配させる。遺伝子判定を同様の方法で行ってヒト P P A R  $\alpha$  が 2 コピーおよびノックアウトされた LDL 受容体遺伝子の欠損部分のみが確認されたマウスをヒト P P A R  $\alpha$  ホモ Tg  $\cdot$  LDL 受容体ホモ欠損マウスとして選択する。

(3) ヒト apoA-I ホモ Tg マウスとの交配

実施例 2 において作製されたヒト P P A R  $\alpha$  ホモ Tg マウスと高脂血症（動脈硬化）疾患モデルであるヒト apoA-I ホモ Tg マウス（Jackson 研究所、米国；C57BL/6J を遺伝的背景とする）とを交配させて得られる産仔の雌雄同士を交配させる。得られるマウス産仔の尾から上記と同様にして DNA を抽出してサザン解析を行ない、ヒト P P A R  $\alpha$  の DNA およびヒト apoA-I 遺伝子

- が全ての産仔から検出された親マウスを、ヒト P P A R  $\alpha$  ・ヒト apoA-I ヘテロ Tg マウスとして選択する。次にその雌雄同士を交配させる。得られた産仔の遺伝子判定を同様の方法で行ってヒト P P A R  $\alpha$  およびヒト apoA-I がそれぞれ 2 コピー確認されたマウスをヒト P P A R  $\alpha$  ・ヒト apoA-I ホモ Tg マウスとして選択する。
- (4) さらに、上記(1)～(3)のそれぞれにおいて、実施例 2 で作製されたヒト P P A R  $\alpha$  ホモ Tg マウスの代わりに、実施例 4 において作製されたヒト P P A R  $\alpha$  ホモ Tg ・マウス P P A R  $\alpha$  ホモ欠損マウスを用いて、同様の手順により apoE ホモ欠損マウス、LDL 受容体ホモ欠損マウスおよびヒト apoA-I Tg マウスとそれぞれ交配させる。

#### 産業上の利用可能性

- 本発明の異種 P P A R  $\alpha$  導入・疾患モデル非ヒト哺乳動物は、該異種 P P A R  $\alpha$  に対しては作用するが、該非ヒト哺乳動物の内因性 P P A R  $\alpha$  に対しては作用しない P P A R  $\alpha$  作動薬もしくは拮抗薬のインビボでの薬効を評価することができるので、P P A R  $\alpha$  の活性調節が関与する各種疾患の予防・治療薬の開発において有用なスクリーニング系を提供するものである。

#### 配列表フリーテキスト

- 20 配列番号：3

ヒト S A P プロモーターを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：4

- 25 ヒト S A P プロモーターを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：5

ウサギ  $\beta$  -グロビンエンハンサーを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：6

ウサギ $\beta$ -グロビンエンハンサーを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：7

- 5 ヒトPPAR $\alpha$  cDNAフラグメントを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：8

ヒトPPAR $\alpha$  cDNAフラグメントを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号：9

- 10 PCRにより増幅されたヒトPPAR $\alpha$  cDNAフラグメントを検出するための蛍光発生プローブとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチド。



## 請求の範囲

1. 異種PPAR $\alpha$ をコードするDNAを発現可能な状態で安定に保持し、  
且つ1以上の他の遺伝子改変を有する非ヒト哺乳動物またはその生体の一部。  
5
2. 他の遺伝子改変の少なくとも1つが、PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する  
疾患と同一もしくは類似の病態を生じさせるものである、請求項1記載の動  
物またはその生体の一部。
- 10 3. 他の遺伝子改変の少なくとも1つが、PPREを有するプロモーターの  
制御下にある外来DNAの導入である、請求項1記載の動物またはその生体  
の一部。
4. 異種PPAR $\alpha$ がヒト由来PPAR $\alpha$ である請求項1記載の動物または  
15 その生体の一部。
5. 異種PPAR $\alpha$ が配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実  
質的に同一のアミノ酸配列を有する請求項1記載の動物またはその生体の一  
部。  
20
6. 非ヒト哺乳動物が、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マ  
ウスまたはラットである請求項1記載の動物またはその生体の一部。
7. 非ヒト哺乳動物がマウスである請求項1記載の動物またはその生体の一  
25 部。
8. 内因性PPAR $\alpha$ を欠損するかわりに異種PPAR $\alpha$ を発現させた動物  
である請求項1記載の動物またはその生体の一部。

9. 内因性PPAR $\alpha$ を欠損する動物と、異種PPAR $\alpha$ を発現する、該動物と同種の動物とを交配することにより得られうる、請求項8記載の動物またはその生体の一部。

- 5     10. 内因性PPAR $\alpha$ がマウス由来PPAR $\alpha$ であり、異種PPAR $\alpha$ がヒト由来PPAR $\alpha$ である請求項8記載の動物またはその生体の一部。

11. PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患が、高脂血症、高トリグリセリド血症、混合型脂質異常症、低HDL血症、動脈硬化症、末梢動脈閉塞症、  
10   間欠性跛行、壊疽、高血圧症、血栓症、虚血性心疾患、急性心筋梗塞、心不全、鬱血性心不全、不安定狭心症、PTCA後の再狭窄、ステント留置後の再狭窄、高フィブリノーゲン血症、心筋症、脳出血、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳卒中、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎動脈硬化症、皮膚炎、免疫不全、低血糖、低ケトン血症、脂肪肝、糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、肥満、アルツハイマー病、貧血性低酸素症、性腺障害、肝臓癌、  
15   乳癌および子宮内膜炎からなる群より選択される1もしくは2以上の疾患である請求項2記載の動物またはその生体の一部。

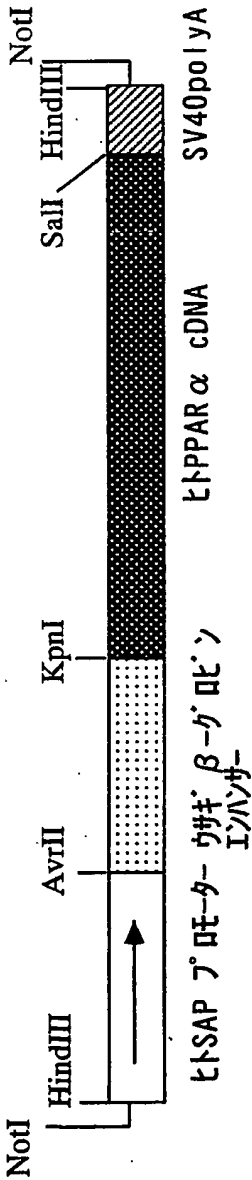
12. 異種PPAR $\alpha$ が、肝臓、心臓、腎臓、副腎、血管、消化管および脳  
20   からなる群より選択される1もしくは2以上の部位で特異的に発現することを特徴とする請求項1記載の動物またはその生体の一部。

13. 異種PPAR $\alpha$ が、肝臓で特異的に発現することを特徴とする請求項1記載の動物またはその生体の一部。

- 25   14. 請求項1記載の動物またはその生体の一部に被験物質を適用し、該物質の異種PPAR $\alpha$ に対するアゴニストまたはアンタゴニスト活性を検定することを特徴とする異種PPAR $\alpha$ 作動薬または拮抗薬のスクリーニング方法。

15. 請求項3記載の動物またはその生体の一部に被験物質を適用し、該物質の異種PPAR $\alpha$ に対するアゴニストまたはアンタゴニスト活性を、PPREを有するプロモーターの制御下にある外来DNAの発現を指標にして検  
5 定することを特徴とする、異種PPAR $\alpha$ 作動薬または拮抗薬のスクリーニング方法。

16. 請求項2記載の動物に被験物質を投与し、該動物におけるPPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患と同一もしくは類似の病態に及ぼす該物質の効果  
10 を検定することを特徴とする、異種PPAR $\alpha$ の由来する動物における該PPAR $\alpha$ の活性調節が関与する疾患に対して予防・治療活性を有する物質のスクリーニング方法。



pKS-SEPP2

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Transgenic Disease Model Animal Harboring Heterologous PPAR-alpha  
and Use Thereof

<130> 3071W00P

<150> JP 2002-206162

<151> 2002-07-15

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

 $\langle 210 \rangle$  1

1404 &lt;211&gt;

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> CDS

<222> (1)..(1404)

〈223〉

 $\langle 400 \rangle$  1

atg	gig	gac	acg	gaa	agc	cca	ctc	tgc	ccc	ctc	tcc	cca	ctc	gag	gcc	48
Met	Val	Asp	Thr	Glu	Ser	Pro	Leu	Cys	Pro	Leu	Ser	Pro	Leu	Glu	Ala	
1			5					10						15		
ggc	gat	cta	gag	agc	ccg	tta	tct	gaa	gag	ttc	ctg	caa	gaa	atg	gga	96
Gly	Asp	Leu	Glu	Ser	Pro	Leu	Ser	Glu	Glu	Phe	Leu	Gln	Glu	Met	Gly	
			20					25						30		
aac	atc	caa	gag	att	tcg	caa	tcc	atc	ggc	gag	gat	agt	tct	gga	agc	144
Asn	Ile	Gln	Glu	Ile	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Ser	Gly	Ser	
			35					40						45		
ttt	ggc	ttt	acg	gaa	tac	cag	tat	tta	gga	agc	tgt	cct	ggc	tca	gat	192



245	250	255	
aag ctg gtg gcc aat ggc atc cag aac aag gag gcg gag gtc cgc atc			816
Lys Leu Val Ala Asn Gly Ile Gln Asn Lys Glu Ala Glu Val Arg Ile			
260	265	270	
ttt cac tgc tgc cag tgc acg tca gtg gag acc gtc acg gag ctc acg			864
Phe His Cys Cys Gln Cys Thr Ser Val Glu Thr Val Thr Glu Leu Thr			
275	280	285	
gaa ttc gcc aag gcc atc cca ggc ttc gca aac ttg gac ctg aac gat			912
Glu Phe Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Ala Asn Leu Asp Leu Asn Asp			
290	295	300	
caa gtg aca ttg cta aaa tac gga gtt tat gag gcc ata ttc gcc atg			960
Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val Tyr Glu Ala Ile Phe Ala Met			
305	310	315	320
ctg tct tct gtg atg aac aaa gac ggg atg ctg gta gcg tat gga aat			1008
Leu Ser Ser Val Met Asn Lys Asp Gly Met Leu Val Ala Tyr Gly Asn			
325	330	335	
ggg ttt ata act cgt gaa ttc cta aaa agc cta agg aaa ccg ttc tgt			1056
Gly Phe Ile Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Cys			
340	345	350	
gat atc atg gaa ccc aag ttt gat ttt gcc atg aag ttc aat gca ctg			1104
Asp Ile Met Glu Pro Lys Phe Asp Phe Ala Met Lys Phe Asn Ala Leu			
355	360	365	
gaa ctg gat gac agt gat atc tcc ctt ttt gtg gct gct atc att tgc			1152
Glu Leu Asp Asp Ser Asp Ile Ser Leu Phe Val Ala Ala Ile Ile Cys			
370	375	380	
tgt gga gat cgt cct ggc ctt cta aac gta gga cac att gaa aaa atg			1200
Cys Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Gly His Ile Glu Lys Met			
385	390	395	400
cag gag ggt att gta cat gtg ctc aga ctc cac ctg cag agc aac cac			1248
Gln Glu Gly Ile Val His Val Leu Arg Leu His Leu Gln Ser Asn His			
405	410	415	
ccg gac gat atc ttt ctc ttc cca aaa ctt ctt caa aaa atg gca gac			1296
Pro Asp Asp Ile Phe Leu Phe Pro Lys Leu Leu Gln Lys Met Ala Asp			
420	425	430	
ctc cgg cag ctg gtg acg gag cat gcg cag ctg gtg cag atc atc aag			1344
Leu Arg Gln Leu Val Thr Glu His Ala Gln Leu Val Gln Ile Ile Lys			
435	440	445	

aag acg gag tcg gat gct gcg ctg cac ccg cta ctg cag gag atc tac 1392  
 Lys Thr Glu Ser Asp Ala Ala Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr

450

455

460

agg gac atg tac

1404

Arg Asp Met Tyr

465

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 468

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Val Asp Thr Glu Ser Pro Leu Cys Pro Leu Ser Pro Leu Glu Ala

1

5

10

15

Gly Asp Leu Glu Ser Pro Leu Ser Glu Glu Phe Leu Gln Glu Met Gly

20

25

30

Asn Ile Gln Glu Ile Ser Gln Ser Ile Gly Glu Asp Ser Ser Gly Ser

35

40

45

Phe Gly Phe Thr Glu Tyr Gln Tyr Leu Gly Ser Cys Pro Gly Ser Asp

50

55

60

Gly Ser Val Ile Thr Asp Thr Leu Ser Pro Ala Ser Ser Pro Ser Ser

65

70

75

80

Val Thr Tyr Pro Val Val Pro Gly Ser Val Asp Glu Ser Pro Ser Gly

85

90

95

Ala Leu Asn Ile Glu Cys Arg Ile Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Tyr

100

105

110

His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg

115

120

125

Thr Ile Arg Leu Lys Leu Val Tyr Asp Lys Cys Asp Arg Ser Cys Lys

130

135

140

Ile Gln Lys Lys Asn Arg Asn Lys Cys Gln Tyr Cys Arg Phe His Lys

145

150

155

160

Cys Leu Ser Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile Arg Phe Gly Arg Met

165

170

175

Pro Arg Ser Glu Lys Ala Lys Leu Lys Ala Glu Ile Leu Thr Cys Glu

180

185

190



His Asp Ile Glu Asp Ser Glu Thr Ala Asp Leu Lys Ser Leu Ala Lys  
 195 200 205  
 Arg Ile Tyr Glu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Asn Met Asn Lys Val Lys  
 210 215 220  
 Ala Arg Val Ile Leu Ser Gly Lys Ala Ser Asn Asn Pro Pro Phe Val  
 225 230 235 240  
 Ile His Asp Met Glu Thr Leu Cys Met Ala Glu Lys Thr Leu Val Ala  
 245 250 255  
 Lys Leu Val Ala Asn Gly Ile Gln Asn Lys Glu Ala Glu Val Arg Ile  
 260 265 270  
 Phe His Cys Cys Gln Cys Thr Ser Val Glu Thr Val Thr Glu Leu Thr  
 275 280 285  
 Glu Phe Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Ala Asn Leu Asp Leu Asn Asp  
 290 295 300  
 Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val Tyr Glu Ala Ile Phe Ala Met  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Ser Val Met Asn Lys Asp Gly Met Leu Val Ala Tyr Gly Asn  
 325 330 335  
 Gly Phe Ile Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Cys  
 340 345 350  
 Asp Ile Met Glu Pro Lys Phe Asp Phe Ala Met Lys Phe Asn Ala Leu  
 355 360 365  
 Glu Leu Asp Asp Ser Asp Ile Ser Leu Phe Val Ala Ala Ile Ile Cys  
 370 375 380  
 Cys Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Gly His Ile Glu Lys Met  
 385 390 395 400  
 Gln Glu Gly Ile Val His Val Leu Arg Leu His Leu Gln Ser Asn His  
 405 410 415  
 Pro Asp Asp Ile Phe Leu Phe Pro Lys Leu Leu Gln Lys Met Ala Asp  
 420 425 430  
 Leu Arg Gln Leu Val Thr Glu His Ala Gln Leu Val Gln Ile Ile Lys  
 435 440 445  
 Lys Thr Glu Ser Asp Ala Ala Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr  
 450 455 460  
 Arg Asp Met Tyr  
 465

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying human  
SAP promoter.

<400> 3

actgagtaga agtagcagaa

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying human  
SAP promoter.

<400> 4

cagcggcttg ttcatttcc

20

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying rabbit  
beta-globin enhancer.

<400> 5

tcctaggtaga gaatttcagg gtgagtttg

29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying rabbit beta-globin enhancer.

<400> 6

cggtaccttt gccaaaatga tgagacagc 29

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying human PPAR-alpha cDNA fragment.

<400> 7

cgccagcacg gacga 15

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying human PPAR-alpha cDNA fragment.

<400> 8

ttgtcccccac atattcgaca ctc 23

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as fluorogenic probe for  
detecting human PPAR-alpha cDNA fragment amplified by PCR.

<400> 9

ccccccggcag tgccctgaa

19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08921

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A01K67/027, C12N15/09, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50, A61K45/00, A61P1/16, 3/04, 3/06, 3/10, 7/02, 7/06, 9/10, 9/12, 13/12, 15/00, 17/02, 25/28, 27/02, 35/00, 37/02, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A01K67/027, C12N15/09, 5/10, C12Q1/02, 1/68, G01N33/15, 33/50, A61K45/00, A61P1/16, 3/04, 3/06, 3/10, 7/02, 7/06, 9/10, 9/12, 13/12, 15/00, 17/02, 25/28, 27/02, 35/00, 37/02, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/47478 A2 (DELTAGEN, INC.), 20 June, 2002 (20.06.02), & US 20020112256 A1 & AU 200220274 A	1-16
Y	Sher T. et al., cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. Biochemistry., June 1993, No.32, Vol.21, p.5598-604	1-16
Y	Mukherjee R. et al., Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. J.Steroid Biochem.Mol.Biol., November, 1994, Vol.51, No.3/4, p.157-66	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
28 August, 2003 (28.08.03)

Date of mailing of the international search report  
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08921

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95/11974 A2 (LIGAND PHARM INC.), 04 May, 1995 (04.05.95), & EP 724636 A1 & US 5686596 A & JP 9-505731 A	1-16
P, Y	WO 02/064632 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 22 August, 2002 (22.08.02), (Family: none)	1-16
P, Y	JP 2002-306021 A (ZH OSAKA BIOSCIENCE KENKYUSHO), 22 October, 2002 (22.10.02), (Family: none)	1-16

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl. <sup>7</sup> A01K 67/027, C12N 15/09, 5/10, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/50, A61K 45/00, A61P 1/16, 3/04, 3/06, 3/10, 7/02, 7/06, 9/10, 9/12, 13/12, 15/00, 17/02, 25/28, 27/02, 35/00, 37/02, 43/00		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. <sup>7</sup> A01K 67/027, C12N 15/09, 5/10, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/50, A61K 45/00, A61P 1/16, 3/04, 3/06, 3/10, 7/02, 7/06, 9/10, 9/12, 13/12, 15/00, 17/02, 25/28, 27/02, 35/00, 37/02, 43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Swiss Prot/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI (DIALOG)		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 02/47478 A2 (DELTA GEN, INC.) 2002. 06. 20 & US 20020112256 A1 & AU 200220274 A	1-16
Y	Sher T. et al., cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. Biochemistry. Jun 1993, No. 32, Vol. 21, p. 5598-604	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 28. 08. 03	国際調査報告の発送日 16.09.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JPO) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Mukherjee R. et al., Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. J Steroid Biochem Mol Biol. Nov 1994, Vol. 51, No. 3/4, p. 157-66	1-16
Y	WO 95/11974 A2 (LIGAND PHARM INC) 1995. 05. 04 & EP 724636 A1 & US 5686596 A & JP 9-505731 A	1-16
PY	WO 02/064632 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 2002. 08. 22 (ファミリーなし)	1-16
PY	JP 2002-306021 A (ZH OSAKA BIOSCIENCE KENKYUSHO) 2002. 10. 22 (ファミリーなし)	1-16